

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

L'URÉE ET SES COMPLEXES À CUIVRE COMME AGENTS  
ANTIOXYDANTS ET NEUROPROTECTEURS

MÉMOIRE  
PRÉSENTÉ  
COMME EXIGENCE PARTIELLE  
DE LA MAÎTRISE EN CHIMIE

PAR  
MARIELA GOMEZ PEREZ

MAI 2018

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL  
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.10-2015). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

## REMERCIEMENTS

Je remercie mon directeur, Dr Mircea-Alexandru Mateescu, de m'avoir accepté dans son équipe et pour le soutien qui m'a accordé pendant mes études de maîtrise. Je lui exprime aussi ma gratitude pour ses conseils judicieux et son intérêt pour mon intégration dans la communauté scientifique.

Je remercie infiniment Dre Joanne Paquin pour sa précieuse collaboration et pour nourrir mon averse curiosité scientifique. J'ai beaucoup apprécié son approche pédagogique, son optimisme et son dévouement.

J'aimerais remercier Dre Pompilia Ispas-Szabo et Dr Le Tien Canh pour leur précieuse aide et pour partager leur expertise.

Je tiens à remercier Clara Lafortune-Sgambato et Lyvia Fourcade de partager les techniques expérimentales que j'ai utilisées.

Je suis aussi particulièrement reconnaissante envers mes collègues de laboratoire et en particulier à Victorien Konan pour son précieux soutien moral et ses sages conseils scientifiques.

Certes, je salue la bienveillance des membres de ma famille, Lucia, Miguel et Maria Teresa, qui ont su m'appuyer sans appréhension dans tous mes projets et mes décisions.

Enfin, je remercie la Fondation Courtois pour l'appui à la recherche qui m'a permis aussi l'octroi des bourses d'études durant ma scolarité à l'UQAM. L'octroi d'une bourse des programmes FARE de l'UQAM est également remercié.

## TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES.....	VI
LISTE DES TABLEAUX.....	VIII
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	IX
RÉSUMÉ .....	XI
INTRODUCTION .....	1
CHAPITRE I	
L'URÉE, SES DÉRIVÉS ET LEUR RÔLE DANS LES ORGANISMES VIVANTS .....	2
1.1 L'urée comme produit final du métabolisme.....	2
1.1.1 La biogenèse de l'urée.....	2
1.1.2 Principales caractéristiques de l'urée .....	4
1.1.3 Bioélimination de l'urée.....	5
1.2 L'urée revisitée comme agent bioactif .....	7
1.2.1 L'urée comme agent protecteur contre des espèces radicalaires.....	7
1.2.2 L'urée comme agent cardioprotecteur.....	8
1.2.3 L'urée comme modulateur pharmacologique de l'hyponatrémie .....	9
1.3 Dérivés de l'urée et leur importance biologique potentielle.....	10
1.3.1 Dérivés de l'urée .....	10
1.3.2 Complexe de l'urée avec des ions cuivre (II).....	14
CHAPITRE II	
GÉNÉRALITÉS SUR LE STRESS OXYDATIF, SUR LES ANTIOXYDANTS ET SUR LES MÉTHODES D'ÉVALUATION DES PROPRIÉTÉS ANTIOXYDANTES.....	17
2.1 Le stress oxydatif et les agents prooxydants .....	17
2.2 L'électrolyse comme modalité d'initier un stress oxydatif pour des études <i>in vitro</i> et <i>ex vivo</i> .....	19

2.3	Des antioxydants.....	21
2.3.1	Des antioxydants endogènes .....	23
2.3.2	Des antioxydants exogènes .....	26
2.4	Méthodes d'évaluation des activités antioxydantes.....	29
2.4.1	Méthode colorimétrique 2,2-Diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH).....	31
2.4.2	Méthode colorimétrique Diéthyl-p-phénylènediamine (DEPDA) .....	32
CHAPITRE III		
LE MODÈLE CELLULAIRE P19 POUR L'ÉVALUATION DES PROTECTEURS ANTIOXYDANTS .....		
		34
3.1	Origine et caractéristiques générales .....	34
3.2	Différenciation neuronale .....	35
3.3	Les mesures de viabilité sur des neurones P19 en présence des protéines à cuivre.....	36
CHAPITRE IV		
PRÉSENTATION DU PROJET DE MAÎTRISE.....		
		39
4.1	Les objectifs du projet de maîtrise.....	40
CHAPITRE V		
L'URÉE ET SES COMPLEXES DE CUIVRE COMME AGENTS ANTIOXYDANTS ET NEUROPROTECTEURS.....		
		44
5.1	L'urée et ses complexes de cuivre comme agents antioxydants et neuroprotecteurs.....	45
CHAPITRE VI		
LE TEST ROUGE NEUTRE VERSUS MTT POUR LE DOSAGE DE LA VIABILITÉ CELLULAIRE EN PRÉSENCE DE COMPOSÉS CUIVRIQUES .....		
		65
6.1	Le test rouge neutre versus MTT pour le dosage de la viabilité cellulaire en présence de composés cuivriques .....	66
CHAPITRE VII		
DISCUSSION GÉNÉRALE .....		
		76
7.1	Caractérisation structurale des complexes à cuivre (II).....	77
7.2	Stabilité des complexes à cuivre (II) dans des milieux physiologiques .....	78
7.3	Capacité antioxydante <i>in vitro</i> .....	78

7.4	Le test rouge neutre versus MTT pour le dosage de la viabilité cellulaire en présence de composés cuivriques .....	80
7.5	Biocompatibilité de l'urée, du biuret et de leurs complexes de cuivre (II) .....	81
7.6	Effet de l'urée sur la survie des neurones P19 soumis au stress oxydatif .....	82
	CONCLUSIONS.....	84
	ANNEXE 1	
	CONTRIBUTIONS SCIENTIFIQUES DURANT LE PROJET DE MAÎTRISE .....	85
	ANNEXE 2	
	DONNÉES SUPPLEMENTAIRES SOUMISES EN ANNEXE AU MANUSCRIT « L'URÉE ET SES COMPLEXES DE CUIVRE COMME AGENTS ANTIOXYDANTS ET NEUROPROTECTEURS » .....	87
	ANNEXE 3	
	DONNÉES SUPPLEMENTAIRES ANNEXÉES AU MANUSCRIT « LE TEST ROUGE NEUTRE VERSUS MTT POUR LE DOSAGE DE LA VIABILITÉ CELLULAIRE EN PRÉSENCE DE COMPOSÉS CUIVRIQUES » .....	91
	BIBLIOGRAPHIE .....	93

## LISTE DES FIGURES

Figure	Page
1.1	Schéma des quatre réactions du cycle de l'urée..... 4
1.2	Structures de résonance de l'urée. .... 5
1.3	Formes tautomères de la thiourée ..... 11
1.4	Oxydation métabolique du groupe thiol de la TU produisant cyanamide ..... 12
1.5	Structure de l'hydroxyurée. .... 12
1.6	Structure du biuret. .... 13
1.7	Structures de résonance d'un ligand d'urée lié à un ion métallique ..... 15
1.8	Structures des complexes du biuret avec cuivre (II). (A) $\text{Cu}(\text{NH}_2\text{CONHCONH}_2)_2\text{Cl}_2$ , (B) $\text{K}_2[\text{Cu}(\text{NH}_2\text{CONHCONH}_2)_2]$ ..... 16
2.1	Réactions menant à la formation des EROs..... 18
2.2	Antioxydants endogènes et exogènes. .... 22
2.3	Les principales fonctions de protection du glutathion contre le stress oxydatif. .... 24
2.4	Structure de la molécule de vitamine E et du Trolox®. .... 27
2.5	Synthèse de la vitamine D3 à partir du 7-Déhydrocholestérol. .... 29
2.6	Principe de la méthode colorimétrique DPPH ..... 31
2.7	Principe de la méthode colorimétrique DEPDA..... 32
3.1	Différents inducteurs de différenciation des cellules P19..... 35
3.2	Différenciation des cellules P19 en neurones ..... 36
3.3	Principe du test à base de sel de tétrazolium.. .... 37
4.1	Présentation schématique de l'avancement et des réalisations du projet..... 41
4.2	Présentation schématique des différentes étapes du projet. .... 42

5.1	FTIR spectra of urea, of Cu(II)Urea <sub>2</sub> , of biuret and of Cu(II)Biuret <sub>2</sub> .....	54
5.2	Molecular structure of Cu(II)Urea <sub>2</sub> obtained from crystal X-ray diffraction and molecular structure proposed for Cu(II)Biuret <sub>2</sub> complex. ....	55
5.3	Visible spectra of Cu(II)Urea <sub>2</sub> (A) and of Cu(II)Biuret <sub>2</sub> (B).....	56
5.4	The percentages of remaining ROS after electrolysis (10 mA, 400 V, 1 min) of KH solutions determined by the DEPDA assay (A, B) or of remaining DPPH• radical (C,D).....	59
5.5	Cell viability in the presence of urea or of Cu(II)Urea <sub>2</sub> (A), or of biuret or Cu(II)Biuret <sub>2</sub> (B) .....	61
5.6	Time-dependent effects of KH or of KH ELS on cell viability .....	62
5.7	Effect of different concentrations of urea in cell viability under oxidative stress conditions induced by KH ELS .....	63
6.1	Effect of the number of seeded cells on formazan (A) and NR (B) signals. ....	72
6.2	Spectrophotometric profiles of formazan (A,B), MTT (C,D) and NR (E,F) in the absence and presence of 200 μM (A,C,E) and 10 μM (B,D,F) copper compounds <i>in vitro</i> . ....	74
A 2.1	Concentration-dependent effects of urea in cell viability per the NR assay.. ....	90
A 3.1	Spectrophotometric profiles of formazan in the presence of various concentrations of Cu(II)His <sub>2</sub> (A), Cu(II)Ser <sub>2</sub> (B), Cu(II)Urea <sub>2</sub> (C) and CuCl <sub>2</sub> (D) <i>in vitro</i> . ....	91
A 3.2	Changes in the color of formazan solution upon addition of Cu(II)Ser <sub>2</sub> . ....	92



## LISTE DES TABLEAUX

Tableau		Page
5.1	Physical parameters and composition of Cu(II)Urea <sub>2</sub> and Cu(II)Biuret <sub>2</sub> complexes.....	53
A 2.1	Crystal data and structure refinement for C <sub>2</sub> H <sub>8</sub> Cl <sub>2</sub> CuN <sub>4</sub> O <sub>2</sub> .....	87
A 2.2	Frequencies and assignation of characteristic bands of urea and Cu(II)Urea <sub>2</sub> .....	88
A 2.3	Frequencies and assignation of characteristic bands of biuret and Cu(II)Biuret <sub>2</sub> .....	88
A 2.4.1	Bond Lengths for C <sub>2</sub> H <sub>8</sub> Cl <sub>2</sub> CuN <sub>4</sub> O <sub>2</sub> .....	89
A 2.4.2	Bond Angles for C <sub>2</sub> H <sub>8</sub> Cl <sub>2</sub> CuN <sub>4</sub> O <sub>2</sub> .....	89
A 2.4.3	Hydrogen Bonds for C <sub>2</sub> H <sub>8</sub> Cl <sub>2</sub> CuN <sub>4</sub> O <sub>2</sub> .....	89
A 2.4.4	Hydrogen Atom Coordinates (Å×10 <sup>4</sup> ) and Isotropic Displacement Parameters (Å <sup>2</sup> ×10 <sup>3</sup> ) for C <sub>2</sub> H <sub>8</sub> Cl <sub>2</sub> CuN <sub>4</sub> O <sub>2</sub> .....	90

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

ABTS•	Sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azinobis-3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique
ADP	Adénosine diphosphate
AH	Antioxydant
AO	Amine oxydases
AR	Acide rétinoïque
ATP	Adénosine triphosphate
C	Carbone
CAT	Catalase
Cl <sup>-</sup>	Ion chlorure
CO <sub>2</sub>	Dioxyde de carbone
CP	Céruloplasmine,
Cu <sup>2+</sup> , Cu(II)	Ion cuivre (II)
Cu(II)Biuret <sub>2</sub>	Complexe de biuret et cuivre (II)
CuCl <sub>2</sub>	Chlorure de cuivre (II)
Cu(II)His <sub>2</sub>	Complexe de histidine et cuivre (II)
Cu(II)Ser <sub>2</sub>	Complexe de serine et cuivre (II)
Cu(II)Urée <sub>2</sub>	Complexe de urée et cuivre (II)
CUPRAC	Dosage de réduction de cuivre D
DAO	Diamine oxydase
DEPDA	N,N-diéthyl-p-phénylènediamine
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DPPH	2,2-Diphényl-1-picrylhydrazyl
ELS	Electrolyse
ERO	Espèces réactives d'oxygène
EtOH	Éthanol
Fe <sup>2+</sup> , Fe(II)	Ion ferreux
Fe <sup>3+</sup> , Fe(III)	Ion ferrique
FTIR	Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier
GPx	Glutathion peroxydase
GRx	Glutathion réductase
GSH	Glutathion
GSSG	Glutathion disulfure (oxydé)
H	Hydrogène
H <sub>2</sub> O	Eau
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Péroxyde d'hydrogène
HAT	Transfert d'atomes d'hydrogène

HBS/G	Solution tampon HEPES enrichie en D-glucose
HEPES	Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
His	L-Histidine
HU	Hydroxyurée
J	Jour
K <sup>+</sup>	Ion potassium
KH	Tampon Krebs Henseleit
KH ELS	Tampon Krebs Henseleit électrolisé
LDH	Lactate déshydrogénase
LOO•	Radical peroxyde
MTT	Bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényle tetrazolium
N	Azote
Na <sup>+</sup>	Ion sodium
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (réduit)
NH <sub>3</sub>	Ammoniac
NO•	Monoxyde d'azote
•O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Anion superoxyde
•OH	Radical hydroxyle
<sup>1</sup> O <sub>2</sub>	Oxygène singulet
OONO <sup>-</sup>	Anion peroxydite
PBS	Tampon phosphate
PRIF	Pouvoir de réduction des ions ferriques
RN	Colorant Rouge Neutre
RLO	Radicaux libres d'oxygène
SAO	Aminé oxydase sérique
Ser	L-Serine
SGF	Fluide gastrique simulé
SH	Solutions salines hypertoniques
SIF	Fluid intestinal simulé
SNB(-AO)	Milieu neurobasal supplémentaire sans antioxydant
SNB	Milieu neurobasal supplémentaire
SNC	Système nerveux central
SOD	Superoxyde dismutase
TAH	Transfert d'atomes d'hydrogène
TE	Transfert d'électrons
TEAC	Capacité antioxydante équivalente de Trolox
α-TO•	Radical α-tocophérol
TTCP	Teneur totale en composés phénoliques
TU	Thiourée
UT	Transporteurs d'urée
Vit E, TOH	Vitamine E

## RÉSUMÉ

L'urée a été largement considérée, comme un produit du déchet du métabolisme. Cependant, de manière similaire aux protéines à cuivre (céruloplasmine et amine oxydase), l'urée et certains dérivés ont précédemment été considérés comme agents antioxydants et comme cardioprotecteurs. Ainsi nous avons lancé l'hypothèse que l'urée, le biuret, et leurs complexes cuivriques,  $\text{Cu(II)Urée}_2$  et  $\text{Cu(II)Biuret}_2$ , pourraient présenter un effet neuroprotecteur contre le stress oxydatif.

L'objectif principal était d'investiguer le rôle de l'urée et des complexes cuivriques sur des cellules neuronales P19 en absence et en présence d'un stress oxydatif. L'élaboration d'une méthode améliorée basée sur le réactif Rouge Neutre à la place du test Bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényle tetrazolium pour évaluer la viabilité des cellules neuronales P19 en présence des agents cuivriques était un autre axe de ce projet de maîtrise. D'abord, les complexes de cuivre (II) ont été synthétisés, leurs structures probables vérifiées par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier, diffraction de rayons X et analyse élémentaire. Ensuite, la capacité antioxydante et la biocompatibilité de l'urée, du biuret et de leurs complexes à cuivre (II) ont été évaluées. Les résultats ont montré que les complexes cuivriques ont une activité antioxydante *in vitro* comparable à celle de l'urée et du biuret lorsqu'elle est testée avec les tests 1,1-diphényl-2,2-picrylhydrazyl et N,N-diéthyl-p-phénylènediamine. La capacité de piégeage d'espèces radicalaires était en fonction de la concentration. Pour l'évaluation de la viabilité cellulaire, les résultats de cette étude ont montré que les composés à cuivre (II) peuvent interagir avec le produit de la réduction mitochondriale du Bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényle tetrazolium. Contrairement, le dosage par le test Rouge Neutre semble dépourvu d'effets d'interférence par des composés de cuivre.

La biocompatibilité des composés a été évaluée par le test Rouge Neutre sur des neurones P19. Le biuret et les complexes à cuivre (II) présentaient une cytotoxicité modérée. Par contre, l'urée a également présenté une bonne biocompatibilité à des concentrations jusqu'à 5 mM sur le modèle neuronal P19. En outre, il a été constaté que l'urée a un effet protecteur sur les neurones P19 contre les dommages causés par les espèces réactives d'oxygène pour des concentrations comprises entre 0,5 à 5 mM. Les résultats obtenus peuvent être considérés comme innovateurs, en ajoutant des points de vue inédits sur l'urée qui était considérée un déchet toxique. La nouveauté de nos résultats, dans le cadre de ce projet de maîtrise, est l'effet que l'urée, signalée comme agent antioxydant ayant une action cardioprotectrice à des concentrations physiologiques (2.5-7.5 mM), montre une action neuroprotectrice. Cet aspect est important considérant que les neurones sont particulièrement sensibles au stress oxydatif, l'une des causes de maladies neurodégénératives (Alzheimer et Parkinson).

Mots clés : *Urée, biuret, complexes à cuivre (II), neurones P19, espèces réactives d'oxygène, antioxydant, test de viabilité RN.*

## INTRODUCTION

L'urée, à hautes concentrations, provoque des perturbations dans de nombreux processus cellulaires. Cependant, à des concentrations physiologiques, il a été montré que l'urée protège les organes vitaux (cerveau, foie, cœur) contre les dommages dus à la peroxydation lipidique. L'urée et ses dérivées ont été aussi montrés jouer un rôle comme agents antioxydants et cardioprotecteurs, tout comme des protéines à cuivre (céruloplasmine et amine oxydase). Autres recherches révoquent le rôle de la céruloplasmine comme agent neuroprotecteur et neuromodulateur.

La présence du cuivre dans la structure de ces protéines est indispensable pour leur fonctionnalité. Cependant, des applications pharmacologiques pour ces protéines d'origine animale ont des contraintes. Donc, il était intéressant d'étudier des composés à cuivre de bas poids moléculaire avec un potentiel thérapeutique comme une solution alternative à cette problématique. Pour cela, l'étude de la capacité antioxydante et de la biocompatibilité de l'urée, du biuret et des complexes : cuivre (II) urée ( $\text{Cu (II) Urea}_2$ ) et cuivre (II) biuret ( $\text{Cu (II) Biuret}_2$ ) est incluse dans le contexte de cette recherche. Également, le possible effet neuroprotecteur contre le stress oxydatif de l'urée a été étudié en utilisant des neurones P19 comme modèle .

Compte tenu de ces différents aspects, dans l'introduction, composée de trois chapitres, des informations sur l'urée, ses dérivées et leurs complexes à cuivre (II) ainsi que leur rôle dans les organismes vivants sont présentées. Les généralités sur le stress oxydatif, sur les antioxydants et sur les méthodes d'évaluation des propriétés antioxydantes sont aussi exposées ainsi qu'un bref aperçu sur le modèle cellulaire P 19 et les différents tests pour mesurer la viabilité de neurones sont aussi abordés. Finalement, cette mise en contexte est suivie des hypothèses et objectifs du projet de recherche.

## CHAPITRE I

### L'URÉE, SES DÉRIVÉS ET LEUR RÔLE DANS LES ORGANISMES VIVANTS

#### **1.1 L'urée comme produit final du métabolisme**

Les protéines et les peptides exogènes provenant fondamentalement de l'alimentation doivent premièrement être hydrolysés avant d'être absorbés. Différentes enzymes protéolytiques du tractus digestif combinent leur action pour hydrolyser les protéines ingérées permettant ainsi l'absorption des acides aminés. Les voies du catabolisme des aminoacides sont complexes et produisent nombreux intermédiaires qui participent comme précurseurs d'autres constituants cellulaires (Lehninger et al, 1994).

En général, le catabolisme des acides aminés conduit à la formation des cétoacides et d'ammoniac. La voie primaire d'élimination de l'ammoniac en excès est un processus appelé le cycle de l'urée (également connu sous le nom de «cycle de l'ornithine») qui a lieu principalement dans le foie (Lehninger et al, 1994). De façon globale, une molécule d'urée est générée par la combinaison de deux molécules d'ammoniac provenant de la dégradation terminale des acides aminés (l'arginine, la citrulline et l'ornithine) avec une molécule de dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>) en consommant quatre liaisons phosphate (Goodman, 2002).

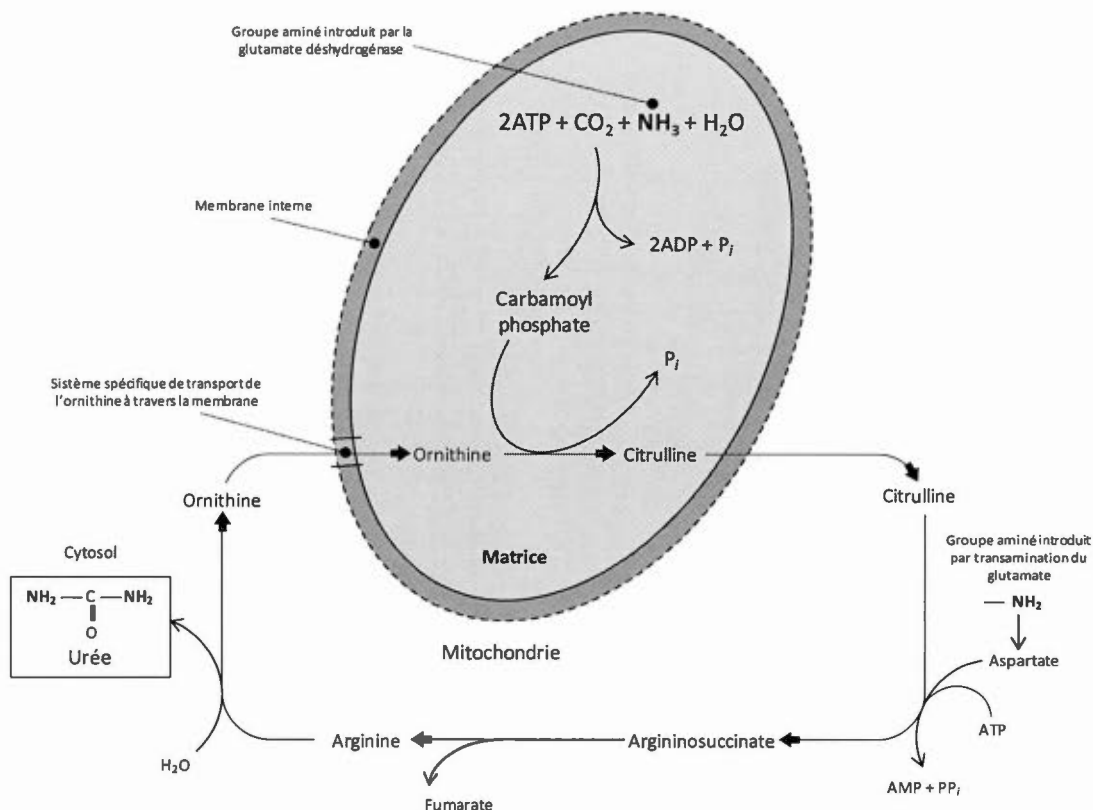
##### **1.1.1 La biogenèse de l'urée**

Le cycle de l'urée (Fig. 1.1) est composé de quatre réactions. La première réaction se produit dans la matrice des mitochondries et les réactions suivantes se produisent dans

le cytosol (Meijer et al, 1990). Le premier groupe aminé qui entre dans le cycle est fourni sous forme d'ammoniac libre provenant de la désamination oxydative du glutamate par les mitochondries hépatiques. L'ammoniac libre est alors utilisé en même temps que le CO<sub>2</sub> pour former le carbamoyl phosphate, réaction essentiellement irréversible, catalysée par la carbamoyl phosphate synthétase et dans laquelle deux molécules d'ATP (adénosine triphosphate) sont indispensables (Lehninger et al, 1994). Dans la première réaction du cycle, le carbamoyl phosphate formé dans la mitochondrie hépatique cède son groupe carbomoyl à l'ornithine pour former la citrulline, réaction qui est catalysée par l'ornithine carbamoyltransférase. La citrulline quitte la matrice mitochondriale et pénètre dans le cytosol où vont se passer les autres réactions du cycle de l'urée (Meijer et al, 1990).

La seconde réaction est catalysée par l'argininosuccinate synthétase, le deuxième groupe aminé indispensable dans la synthèse de l'urée est fourni sous forme d'aspartate. Le groupe aminé de l'aspartate se condense avec l'atome de carbone du groupe carbamoyl de la citrulline en présence d'ATP pour former l'argininosuccinate. La troisième étape est catalysée par l'argininosuccinate lyase qui clive l'argininosuccinate en fumarate et arginine. La dernière étape est catalysée par l'arginase qui clive l'arginine pour produire l'urée et l'ornithine, complétant le cycle (Lehninger et al, 1994).

L'urée est produite principalement à partir de l'arginine dans le cycle de l'urée au foie. Également, elle peut être formée à partir de la dégradation de l'acide urique ou de l'arginine (Campbell, 1997). Dans les tissus extrahépatiques, l'urée est aussi produite en tant que sous-produit de la synthèse de l'ornithine à partir de l'arginine via l'arginase dans la première étape de la synthèse des polyamines (De Bandt et al, 2006).



**Figure 1.1** Schéma des quatre réactions du cycle de l'urée. La première réaction se produit dans la matrice des mitochondries et les réactions suivantes se produisent dans le cytosol (d'après Lehninger et al, 1994).

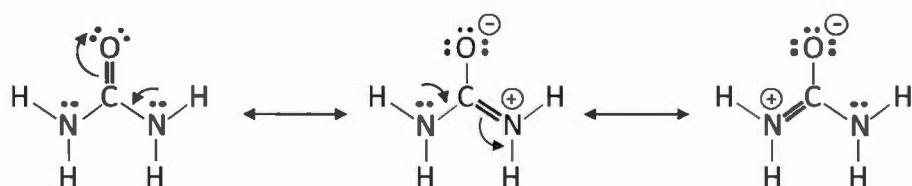
Le principal rôle attribué à la biosynthèse de l'urée est la régulation des troubles chroniques acide-base dans les organismes uréotéliques. En fait, le cycle de l'urée est une voie métabolique qui consomme relativement peu d'ATP et constitue une source unique des protons nécessaires pour la régulation du pH dans l'organisme (Atkinson, 1992).

### 1.1.2 Principales caractéristiques de l'urée

L'urée :  $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ , est une petite molécule polaire (60 Da) utilisée dans de nombreux domaines, tels que les industries agricoles, pharmaceutiques, chimiques et médicales. C'est une base faible qui forme des sels avec des acides et des complexes avec les



métaux de transition (Theophanides et al, 1987). Les trois structures de résonance de l'urée sont présentées dans la figure 1.2. Les deux atomes d'azote et l'atome d'oxygène du groupe carbonyle de l'urée ont des doublets d'électrons non partagés. Donc, l'urée peut former de fortes liaisons d'hydrogène avec d'autres molécules d'urée ou avec des molécules de solvants, ainsi que participer dans de liaisons covalentes de coordination (House et al, 2017).



**Figure 1.2** Structures de résonance de l'urée (d'après Theophanides, 1987).

### 1.1.3 Bioélimination de l'urée

L'ensemble des réactions biochimiques qui permettent la désamination des acides aminés conduit à la formation d'ammoniac. Étant très toxique, l'ammoniac est converti en urée, majoritairement dans le foie, et transporté par le sang vers les reins (Lehninger et al, 1994). L'urée traverse les membranes cellulaires de deux façons fondamentales (Sands, 2003) : (i) à travers des pores aqueux non spécifiques, (ii) à travers des transporteurs de membrane spécialisés. Chez les mammifères, il existe deux types de transporteurs d'urée UT-A et UT-B. Les transporteurs UT-A sont principalement exprimés dans les cellules épithéliales rénales tandis que UT-B montre une distribution plus large dans les reins, le cœur, le cerveau, les testicules, les voies urinaires et d'autres tissus (Li, et al, 2012; Sands, 2003). Si bien la perméabilité de l'urée à travers la membrane lipidique cellulaire est très faible ( $4 \times 10^{-6}$  cm/s), après un certain temps, l'urée peut diffuser lentement jusqu'à un état d'équilibre stationnaire (Weiner et al, 2015).

Dans les reins, l'urée est fondamentalement éliminée par filtration glomérulaire (Klein, Blount, & Sands, 2011). En général, 30 % à 50 % de l'urée filtrée est éliminée. L'excrétion de l'urée est un processus complexe dans lequel différents solutés comme  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  sont aussi impliqués (Li et al, 2012). Les principales isoformes UT-A rénales, UT-A1, UT-A2 et UT-A3, agissent ensemble pour concentrer l'urée dans la médulla rénale, annulant ainsi les effets osmotiques de l'urée dans l'urine. Cette action permet la réabsorption de l'eau secondaire au transport des sels à travers du canal collecteur médullaire, ainsi comme l'excrétion de l'urine hyperosmotique (Smith, 2009). L'insuffisance des fonctions excrétrice et régulatrice des reins peut conduire à un excès d'urée dans le sang (azotémie ou urémie).

La toxicité de l'urée, classiquement considérée comme un déchet métabolique, est un sujet controversé. Différentes études réalisées auprès des patients souffrant de déficience rénale chronique signalent que l'excès d'urée dans le sang peut stimuler la production d'espèces réactives d'oxygène (Reddy et al, 2002) et favoriser la carbamylation des protéines (Berg et al, 2013; Stim et al, 1995). Autres auteurs remarquent que les concentrations élevées d'urée peuvent affecter nombreux processus cellulaires (Burg et al, 2007).

Néanmoins, il existe des rapports basés sur des patients qui mettent en doute l'hypothèse selon laquelle l'urée est un toxique qui doit être totalement éliminé de l'organisme. Des études de cas chez des patients atteints d'azotémie provoquée par un défaut génétique (Hsu et al, 1978) ou par des régimes alimentaires hautement protéiniques (Richards et al, 1975) ont montré qu'une augmentation prolongée de la concentration d'urée dans l'organisme ne produit pas de réactions toxiques, au moins chez les patients ayant une fonction rénale normale (Weiner et al, 2015).

## **1.2 L'urée revisitée comme agent bioactif**

La cinétique de la production, de l'excrétion et de l'hydrolyse de l'urée a été largement étudiée chez l'homme, tout comme sa modulation par différents facteurs physiopathologiques et diététiques, y compris l'activité physique (Forslund et al, 1999, Badaloo et al, 1999, Young et al, 2000). Aussi les transporteurs d'urée et la régulation de leur excrétion ont été amplement étudiés. Cependant, très peu des recherches ont été consacrées à éclairer les rôles de l'urée dans l'organisme (Fouillet et al, 2008).

Traditionnellement, l'urée a été considérée comme jouant un rôle relativement passif dans l'organisme. L'une des fonctions les plus documentées est reliée au fait que l'urée est une substance osmotiquement active. Donc, les changements dans sa concentration peuvent contribuer à l'osmorégulation principalement au niveau des reins (Atkinson, 1992). D'autres études ont montré qu'elle stimule également la transcription et l'expression des gènes précoces immédiats (Cohen et al, 1996).

La connaissance, des possibles rôles ou fonctions de l'urée dans l'organisme, est importante, car elle est le principal composé azoté qui circule dans le sang chez les mammifères ayant la capacité de traverser la membrane cellulaire grâce aux transporteurs qui se trouvent dans divers tissus. Également, l'urée peut être synthétisée dans différents organes au-delà du foie. Ainsi, l'urée pourrait être considérée comme une substance polyvalente multifonctionnelle (Sachs et al, 2006).

### **1.2.1 L'urée comme agent protecteur contre des espèces radicalaires**

La capacité de l'urée de piéger des espèces radicalaires a été rapportée par Wang et al (1999). Les résultats observés *in vitro* ont signalé la capacité de piégeage de l'urée indiquant sa participation dans la défense antioxydante de l'organisme. En outre, une augmentation de la capacité antioxydante du sérum a été également trouvée chez les patients souffrant de maladies rénales (Sofic et al, 2002). Cette augmentation était presque entièrement due à l'urée sérique relativement élevée présente chez les patients

examinés. Contrairement, après l'hémodialyse quand la concentration d'urée sérique a sensiblement diminué, la capacité antioxydante du sérum était considérablement réduite (Sofic et al, 2002).

En tant qu'antioxydant, l'urée présente plusieurs avantages par rapport aux autres antioxydants naturels ou synthétiques. En raison de son faible poids moléculaire, l'urée semble plus mobile par rapport aux antioxydants macromoléculaires tels que la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT) et la céruloplasmine (CP), dont la capacité antioxydante totale semble confinée par leur mobilité limitée et pour certains, leur distribution compartimentée (Wang et al, 1999). Parmi les principaux antioxydants naturels qui se trouvent dans le sérum sanguin, la contribution de la vitamine E ou de la vitamine C à l'activité antioxydante totale du sérum est très faible dû à leurs pauvres concentrations plasmatiques (Valko et al, 2007) et à la capacité de la vitamine C d'agir aussi comme un pro-oxydant (Chow, 1988).

### **1.2.2 L'urée comme agent cardioprotecteur**

Le potentiel de l'urée comme agent cardioprotecteur vient de sa capacité de piégeage des espèces réactives d'oxygène (EROs). Les dysfonctions cardiaques pendant les réperfusions post-ischémiques ont été largement attribuées aux effets néfastes des EROs produits entre autres par la xanthine oxydase au niveau cellulaire. Cependant, l'emploi des inhibiteurs de cette enzyme pour prévenir les dommages cardiaques (Nanduri et al, 2013) entraîne des effets secondaires dus à l'emploi des inhibiteurs eux-mêmes ou à l'accumulation des substrats de la xanthine oxydase (Berry et al, 2004).

Différentes études ont centré leur effort pour trouver des agents capables de réduire les lésions d'ischémie-réperfusion cardiaques. Si bien des antioxydants comme le mannitol ou la vitamine E et des piègeurs d'EROs comme la superoxyde dismutase ont montré une capacité pour atténuer le développement des troubles cardiaques, certaines propriétés de ces substances comme leur cytotoxicité, leur activité pro-oxydante ou bien leur masse moléculaire élevée ont limité leur emploi en tant qu'agent

cardioprotecteur. Il a été aussi rapporté que la céruloplasmine (Dumoulin et al, 1996; Atanasiu et al, 1998) et l'aminooxydase sérique (Mateescu et al, 1997) exercent un rôle cardioprotecteur. Cependant, étant des protéines d'origine animale, ils existent des limitations pour leur application pharmaceutique (Paradis et al, 2010).

L'importance de l'urée en tant que cardioprotectrice dans le maintien de la fonction normale du cœur a été évaluée sur le cœur isolé du rat et du requin par Wang et al (1999). Dans cette étude, les cœurs isolés soumis au stress oxydatif généré par l'électrolyse en présence d'urée présentaient des fonctions cardiaques normales et une protection des tissus contre les lésions oxydatives. Le piégeage des EROs par l'urée était suffisant pour la récupération de la contractilité normale des muscles ventriculaires. Compte tenu de tous les faits décrits ci-dessus, l'urée pourrait être considérée comme un antioxydant ayant des effets cardioprotecteurs contre le stress oxydatif.

### **1.2.3 L'urée comme modulateur pharmacologique de l'hyponatrémie**

L'urée a été utilisée avec succès pour traiter l'hyponatrémie qui est un trouble électrolytique relié plus précisément à la diminution de la concentration de l'ion sodium plasmatique aux niveaux inférieurs à 130 mmoles par litre de sang. En conséquence, il existe une diminution de l'osmolarité (pression osmotique) du liquide situé en dehors des cellules (Soupart et al, 2007).

Les osmolytes organiques jouent un rôle clé dans l'homéostasie du volume cellulaire. Plusieurs organes, notamment le rein et le cerveau, dépendent en particulier de mécanismes adaptatifs qui régulent leur volume lors des perturbations osmotiques (Soupart et al, 2007). Le cerveau s'adapte à l'hyponatrémie chronique (1 à 2 jours) en extrudant des électrolytes et des osmolytes organiques, limitant ainsi le gonflement des cellules cérébrales. L'hyponatrémie chronique, même si elle est rapidement corrigée, conduit à une myélinolyse cérébrale et aux dommages neurologiques souvent irréversibles (Soupart et al, 1996). La myélinolyse se développe indépendamment des

méthodes utilisées pour corriger le sodium du sérum à l'exception de l'urée. La correction avec l'urée réduit considérablement les lésions cérébrales (Soupart et al, 1991). Le mécanisme par lequel l'urée peut réduire la pression intracrânienne et le volume d'eau du cerveau repose sur le concept selon lequel l'eau diffuse passivement des régions d'osmolalité inférieure vers des régions d'osmolalité supérieures dans le but d'équilibrer les concentrations d'osmoles (Decaux, 2001).

La correction rapide de l'hyponatrémie avec l'urée permet la diminution de l'activation microgliale du cerveau et des signes histologiques de démyélinisation dans le cerveau. Aussi, elle permet de réduire considérablement les variations de la perméabilité de la barrière hématoencéphalique et augmente la viabilité des astrocytes par rapport aux traitements avec des antagonistes des récepteurs de vasopressine ou solutions salines hypertoniques (Kengne et al, 2015). Les différences entre la correction de l'hyponatrémie avec l'urée et les autres traitements pourraient être expliquées par une possible action protectrice du cerveau par l'urée en tenant compte des propriétés antioxydantes et protectrices observées dans le cœur (Soupart et al, 2007)

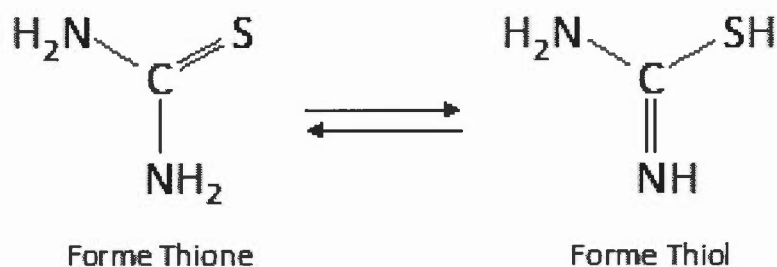
### **1.3 Dérivés de l'urée et leur importance biologique potentielle**

#### **1.3.1 Dérivés de l'urée**

La thiourée (TU) et l'hydroxyurée (HU) sont substances bioactives dérivées de l'urée qui jouent un rôle important dans les réponses physiologiques. La TU et la HU sont reconnues comme des antioxydants puissants, qui ont également des effets cardioprotecteurs comme l'urée intervenant dans la protection du rythme cardiaque et du flux coronaire (Wang et al, 1999). Le biuret est un composé organique obtenu par la condensation de deux molécules d'urée qui peut être considéré comme un dérivé synthétique de l'urée qui présente un potentiel tant qu'antioxydant.

- Thiourée

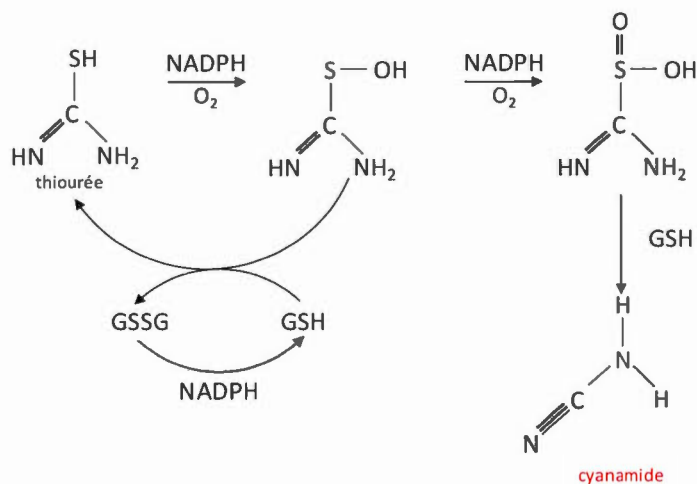
La TU est un solide, cristallin, blanc, dérivé soufré de l'urée de formule  $\text{CH}_4\text{N}_2\text{S}$ . Il est similaire à l'urée, sauf que l'atome d'oxygène est remplacé par un atome de soufre qui présente deux formes tautomères (Fig. 1.3)



**Figure 1.3** Formes tautomères de la thiourée (formes thione et thiol) (d'après Rostkowska et al, 2003)

Les propriétés de l'urée et de la TU diffèrent considérablement en raison des électronégativités relatives du soufre et de l'oxygène. Différentes études ont montré des propriétés antivirales (Chen, et al, 2009) et antifongiques (Shankar, et al, 1981) de la TU. D'autres recherches la signalent comme antioxydant dû à sa capacité de piégeage des espèces radicalaires et de réduire le peroxyde d'hydrogène (Wang et al, 1999; Prasad, 2017).

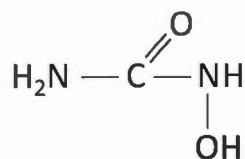
Après administration orale aux humains et aux animaux, la thiourée est presque complètement absorbée et excrétée essentiellement par les reins. Cependant, une transformation métabolique peut avoir lieu en produisant cyanamide qui est plus toxique que la thiourée (Davison et al, 1979; Fox et al, 1983; Smith et al, 2002).



**Figure 1.4** Oxydation métabolique du groupe thiol de la TU produisant cyanamide. (d'après Ziegler-Skylakakis et al, 1998)

#### - Hydroxyurée

L'hydroxyurée ( $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}_2$ ) diffère de l'urée par la présence d'un groupe hydroxyle sur l'un des atomes d'azote (Fig. 1.5). Si bien cette molécule est synthétique, des concentrations d'environ 30 à 200 ng/mL ont été rapportées dans le plasma sanguin humain (Kettani et al, 2009). Cette molécule est reconnue comme un agent antinéoplasique et antiviral non alkylant utilisé dans l'hématologie, l'oncologie, les maladies infectieuses et la dermatologie. Approuvé pour la thérapie de la drépanocytose, l'HU bénéficie aux patients atteints de cette maladie en augmentant le taux d'hémoglobine fœtale (Cokic et al, 2003).



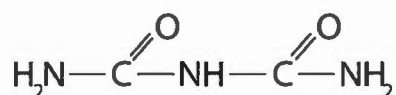
**Figure 1.5** Structure de l'hydroxyurée.



Néanmoins, il a été démontré que HU est un inhibiteur de la ribonucléotide réductase qui est une enzyme clé de la transformation des quatre ribonucléotides en désoxyribonucléotides essentiels dans la synthèse de l'ADN (Sing et al, 2016). La génération des radicaux libres par l'HU cause des effets cytotoxiques sur des cellules (Nakayashiki et al, 2013; Davies et al, 2008). Si bien le mécanisme moléculaire de cet effet reste inconnu, les observations indiquent des membranes cellulaires ciblées par les effets secondaires observés de la toxicité HU (King, 2004; Kovacic et al, 2010).

#### - Biuret

Le biuret ( $C_2H_5N_3O_2$ ) est souvent utilisé avec de l'urée dans l'agriculture comme un engrais très efficace riche en azote. Aussi, il est utilisé dans l'alimentation des animaux en tant que source supplémentaire d'azote non protéique, ayant une meilleure palatabilité par rapport à l'urée (Currier et al, 2004). Dans l'industrie chimique, le biuret est souvent utilisé dans la production des retardateurs de flamme des papiers, de la peinture des textiles, des adhésifs, des résines, des plastiques (Wang et al, 2016). Le biuret contient deux groupes acylamino et un groupe imino (Fig. 1.6), structure compatible avec son utilisation comme ligand neutre dans divers complexes.



**Figure 1.6** Structure du biuret.

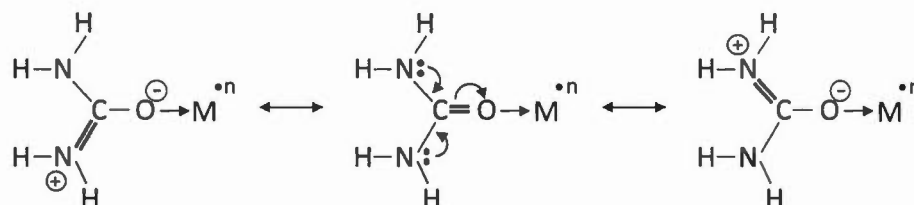
Les complexes d'oligo-éléments avec le biuret pourraient être utilisés comme additifs dans l'alimentation des animaux en complétant à la fois les oligo-éléments et l'azote non protéique, nécessaires à la croissance animale et à l'amélioration de l'efficacité économique (Wang et al, 2016).

### 1.3.2 Complexe de l'urée avec des ions cuivre (II)

L'étude des complexes métalliques de l'urée n'est pas nouvelle, mais le développement des méthodes instrumentales, dans les dernières années, a permis une compréhension plus claire des structures cristallines, des structures moléculaires et des nombres de coordinations de ces complexes métalliques (Theophanides, 1989). L'urée possède trois sites de coordination: l'oxygène du groupe carbonyle et les deux atomes d'azote. Néanmoins, malgré ses trois possibles sites de coordination, l'urée agit habituellement comme un ligand monodenté (Theophanides, 1989). En général, la formation de liaisons métal-oxygène entre les molécules d'urée et les ions métalliques ne provoque que des changements mineurs dans les spectres infrarouges (FTIR) de l'urée. Les changements dans le spectre FTIR dans ce cas sont habituellement : (i) aucun effet important sur les fréquences d'élongation N-H et (ii) une diminution de la fréquence d'élongation C = O (Theophanides, 1989). Cependant, les spectres FTIR des complexes métal-urée diffèrent sensiblement de ceux de l'urée libre si une liaison azote-métal est présente. La formation d'une liaison M-N augmente la demande d'électrons de l'azote et tend également à bloquer la résonance en augmentant la fréquence d'élongation du C = O. Les fréquences d'élongation du CN sont plus faibles en raison du blocage de la résonance (Theophanides, 1989).

Les complexes de l'urée avec les métaux de transition ont été certainement le plus étudiés. En effet, les structures cristallines de nombreux complexes métalliques de l'urée ont été étudiées par différentes méthodes. Dans tous les cas, le ligand de l'urée est lié à l'atome de métal par une liaison métal-oxygène, à l'exception du complexe d'urée-cobalt (Bennett, 1970). À notre connaissance, il est le seul exemple dans la littérature, où une molécule d'urée se lie à deux atomes métalliques via deux sites de coordination; une par l'atome d'oxygène et l'autre parmi l'atome d'azote (ligand bidenté).

La figure 1.7 montre les structures de résonance d'un ligand d'urée lié à un métal par une liaison M-O. L'état d'oxydation de l'atome de métal ne change pas apparemment dans ces complexes (Theophanides, 1989).

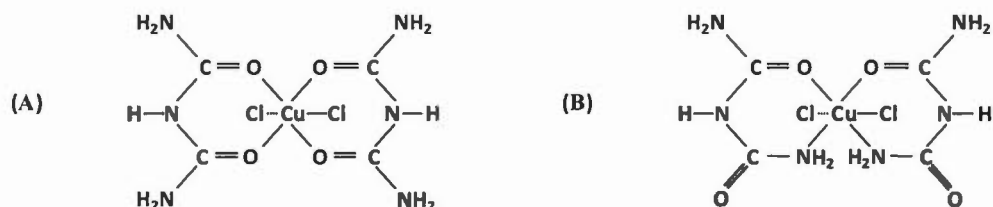


**Figure 1.7** Structures de résonance d'un ligand d'urée lié à un ion métallique (M) par une liaison M-O (d'après Theophanides, 1989)

Plus spécifiquement, le complexe de l'urée avec des ions de cuivre (II), Cu(II)Urée<sub>2</sub>, a été synthétisé et caractérisé par diverses méthodes instrumentales. La composition plus probable du complexe Cu(II)Urée<sub>2</sub>, déterminée par analyse élémentaire et absorption atomique, était Cu(OC(NH<sub>2</sub>))<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (Pop et al, 2002). Le spectre de résonance de spin électronique pourrait être compatible avec une géométrie plane carrée (Radovanovic, et al, 1992). Les mesures de conductivité réalisées en solution aqueuse ont indiqué la nature non-électrolytique du complexe Cu(II)Urée<sub>2</sub> (Pop et al, 2002). Cependant, à notre connaissance, la structure cristalline du Cu(II)Urée<sub>2</sub> n'a pas été décrite auparavant. Certains complexes métaux-urée ont montré des propriétés antimicrobiennes et antivirales et pourraient être considérés comme des molécules ayant un potentiel thérapeutique. Le complexe Cu(II)Urée<sub>2</sub>, aussi, pourrait être considéré comme une molécule ayant un potentiel antioxydant.

Les complexes de métaux des terres rares (Minyu et al, 1986) et des métaux alcalino-terreux (Goodgame et al, 1989) à base de biuret comme ligand ont été décrits. Cependant, les complexes de métaux de transition tels que le cuivre avec biuret ont été rarement signalés (Freeman et al, 1966). La formation de deux types de cycles de chélates différents (Fig. 1.8) du biuret en présence des ions cuivre (II) a été décrite (Freeman et al, 1966). Un complexe violet, K<sub>2</sub>[Cu(NHCONHCONH)<sub>2</sub>] (Fig. 1.8 B),

a été obtenu quand une solution des ions cuivre (II) est ajoutée à une solution alcaline de biuret (Freeman et al, 1966). et un complexe bleu-vert,  $\text{Cu}(\text{NH}_2\text{CONHCONH}_2)_2\text{Cl}_2$ , a été obtenu quand la synthèse a été faite en milieu alcoolique neutre (Fig.1.8 A).



**Figure 1.8** Structures des complexes du biuret avec cuivre (II). (A) Complexe  $\text{Cu}(\text{NH}_2\text{CONHCONH}_2)_2\text{Cl}_2$ , (B) Complexe  $\text{K}_2[\text{Cu}(\text{NH}_2\text{CONHCONH}_2)_2]$  (d'après Freeman, 1966).

Le cuivre est un oligo-élément essentiel qui participe à plusieurs processus biologiques dans tous les organismes vivants (Crisponi et al, 2010). Le cation  $\text{Cu}^{2+}$  est impliqué dans plusieurs réactions biochimiques, mais lorsque son homéostasie est perturbée, le  $\text{Cu}^{2+}$  libre peut devenir toxique (Réaction Fenton) par la génération rapide des EROs (Harris et al, 1996; Shim et al, 2003). Dans le corps, le cuivre existe principalement sous forme liée aux structures des métalloprotéines et des complexes de faible poids moléculaire (Deschamps et al, 2005; Bento et al, 2007). Différentes recherches ont montré que les protéines à cuivre peuvent agir comme antioxydants et comme agents cardioprotecteurs (Dumoulin et al, 1996; Atanasiu et al, 1998). D'autres études ont décrit une activité neuromodulatrice de la céruloplasmine (Maltais et al, 2003; Ducharme et al, 2010). En fait, la fonctionnalité de ces protéines est principalement due à la présence de cuivre (II) dans leurs structures (Bento et al, 2007). Les complexes cuivriques de molécules biologiquement actives comme le biuret ou l'urée pourraient représenter une alternative aux limitations thérapeutiques qui présentent ces macromolécules d'origine animale. Pourtant, des recherches supplémentaires doivent être faites pour montrer leur activité biologique et antioxydante.

## CHAPITRE II

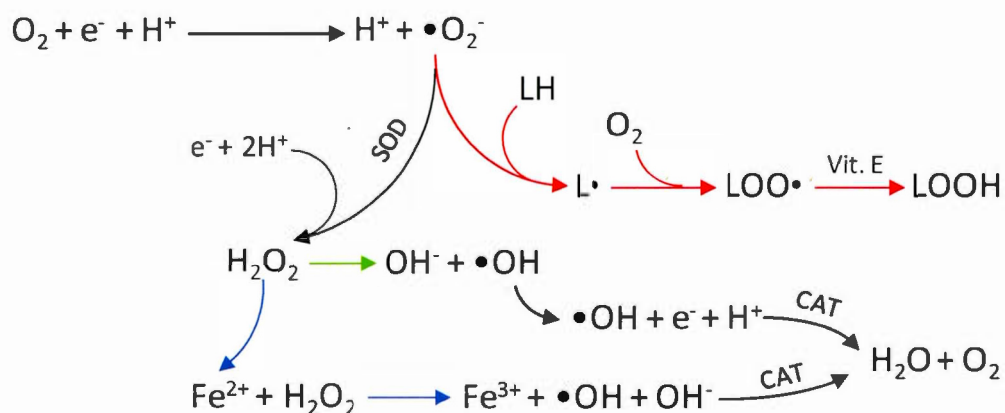
### GÉNÉRALITÉS SUR LE STRESS OXYDATIF, SUR LES ANTIOXYDANTS ET SUR LES MÉTHODES D'ÉVALUATION DES PROPRIÉTÉS ANTIOXYDANTES

#### **2.1 Le stress oxydatif et les agents prooxydants**

Le concept de stress oxydatif a été introduit pour la recherche en biologie et en médecine depuis plus de 30 ans. En conditions normales, des radicaux libres sont produits constamment en faible quantité par divers mécanismes physiologiques. Cette production est contrôlée par des systèmes de défense capables de s'adapter au niveau de radicaux présents dans l'organisme. Cette défense est constituée de différentes substances et mécanismes qui jouent un rôle fondamental en tant qu'antioxydants. Le déséquilibre du rapport antioxydants/prooxydants conduit à l'augmentation des espèces radicalaires. La production excessive de radicaux libres provoque des dommages directs sur des systèmes biologiques par l'oxydation de l'ADN, des protéines, des lipides ou des glucides (Pisoschi et al, 2015). Aussi des lésions secondaires peuvent arriver à cause du caractère cytotoxique et mutagène des métabolites libérés surtout lors de l'oxydation des lipides. L'organisme peut aussi réagir de façon indirecte contre ces composés anormaux par la production d'anticorps, qui malheureusement peuvent promouvoir d'autres réactions chimiques (Sies, 1991). L'ensemble de ce phénomène a été défini comme stress oxydatif.

En général, les espèces radicalaires qui se forment dans les cellules jouent un rôle particulier durant les processus physiologiques normaux. Parmi les espèces radicalaires

se trouvent celles qui dérivent de l'oxygène comme l'anion superoxyde ( $\bullet\text{O}_2^-$ ) et le radical hydroxyle ( $\bullet\text{OH}$ ), ou de l'azote comme monoxyde d'azote,  $\text{NO}\bullet$  (Pisoschi et al, 2015). Entre les espèces dérivées de l'oxygène, dites espèces actives de l'oxygène, se trouvent : l'oxygène singulet ( $^1\text{O}_2$ ), le peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) ou l'anion peroxydite ( $\text{OONO}^-$ ). Même si ces derniers ne sont pas des radicaux libres, ils sont aussi réactifs et peuvent être des précurseurs de radicaux. L'ensemble des radicaux libres et de leurs précurseurs est souvent appelé EROs.



**Figure 2.1** Réactions menant à la formation des EROs. Peroxydation des lipides (L), en rouge. Réaction Haber–Weiss, en vert. Réaction Fenton, en bleu. CAT, catalase; SOD, superoxyde dismutase; Vit. E, vitamine E (d'après Carochi et al, 2013).

Dans les organismes aérobiques, l'oxygène obtenu par la respiration suit une réduction pour obtenir  $\text{H}_2\text{O}$ . Cependant, une réduction partielle de l'oxygène peut avoir lieu (Fig 2.1) menant à la formation du radical superoxyde. Par la suite, une série des réactions se déroulent en produisant des EROs. Ainsi, le radical  $\bullet\text{O}_2$  est transformé en  $\text{H}_2\text{O}_2$  par les superoxyde dismutases (SOD). La catalase (CAT) peut convertir le  $\text{H}_2\text{O}_2$  en  $\text{H}_2\text{O}$  et  $\text{O}_2$ . Néanmoins, le  $\text{H}_2\text{O}_2$  peut aussi générer le radical  $\bullet\text{OH}$  en présence des cations métalliques comme le  $\text{Fe}^{2+}$  ou le  $\text{Cu}^{1+}$  (Réaction Fenton) ou réagir avec les radicaux  $\bullet\text{O}_2^-$  en produisant  $\bullet\text{OH}$  (réaction Haber–Weiss). Les radicaux  $\bullet\text{O}_2^-$  sont capables d'attaquer les lipides, principalement des acides gras polyinsaturés, pour former le

radical peroxyde en complétant la première étape de la peroxydation lipidique. Le radical peroxyde formé se transforme en peroxyde au contact avec d'autres acides gras (Carocho et al, 2013).

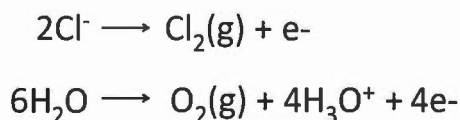
Les prooxydants ont été définis comme les produits chimiques qui induisent un stress oxydatif, généralement par la formation d'espèces réactives ou par l'inhibition des systèmes antioxydants (Puglia et al, 1984). Les EROs, les radicaux libres et certains métaux sont considérés comme des prooxydants. Également, certains antioxydants peuvent avoir un comportement prooxydant.

Le déséquilibre du rapport antioxydants/prooxydants peut avoir de multiples origines. Les processus inflammatoires, la fumée de la cigarette, le métabolisme de certains médicaments, les irradiations ou des métaux comme le chrome, le cuivre ou le fer, peuvent déclencher des réactions qui conduisent à la formation des EROs.

## **2.2 L'électrolyse comme modalité d'initier un stress oxydatif pour des études *in vitro* et *ex vivo***

Le protocole pour l'utilisation de l'électrolyse comme modalité d'initier un stress oxydatif pour des études *in vitro* et *ex vivo* a été développé par Jackson et al (1986). L'étude a montré que le passage du courant électrique à travers d'un tampon physiologique Krebs Henseleit (KH) déclenche une série des réactions chimiques qui génèrent un milieu riche en ERO avec le potentiel de produire des altérations dans un système biologique (Jackson et al, 1986).

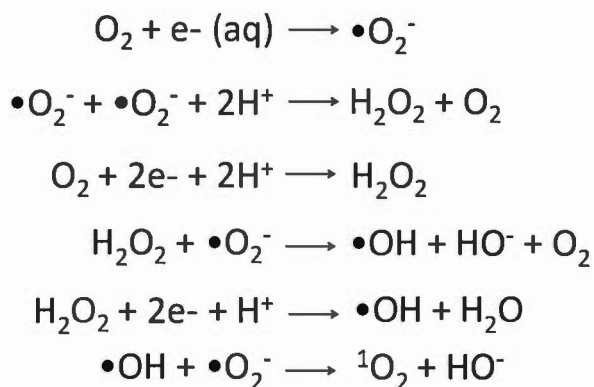
Pour le protocole *in vitro*, le passage du courant électrique à travers du KH dans une cellule électrolytique cause l'oxydation de l'ion chlorure et de l'eau à l'anode. Les réactions peuvent être décrites selon le schéma (Jackson et al, 1986) :



Le mouvement naturel des électrons produits dans la cellule électrolytique est vers la cathode où le H<sub>2</sub>O est réduit selon l'équation suivante :



La formation d'EROs peut maintenant se produire à partir d'une série de réactions chimiques selon :



Aussi des espèces oxydantes dérivées de l'acide hypochloreux peuvent être produites selon :



Dans un protocole *ex vivo*, des cœurs isolés ont été perfusés à une pression et à une température constante avec le tampon KH électrolysé (KH ELS). Différentes études ont montré que la perfusion de cœurs isolés avec KH ELS provoquait des altérations et des lésions oxydatives dans les systèmes biologiques ainsi qu'une augmentation significative de la pression de perfusion coronaire, de la pression diastolique du ventricule gauche et de la perte de pression ventriculaire gauche (Jackson et al, 1986; Wang et al, 1999).



Ce modèle a permis aussi d'évaluer la capacité de différents agents de protéger les cœurs des effets de l'électrolyse. Un effet cardioprotecteur important de l'urée a été montré par cette méthode (Wang et al, 1999). Les résultats observés *in vitro* ont montré que l'urée est capable de piéger d'EROs et inhiber la production du radical monoxyde d'azote NO•. Ils ont également mis en évidence une certaine activité de l'urée comme piègeur des radicaux hydroxyles (•OH) (Wang et al, 1999).

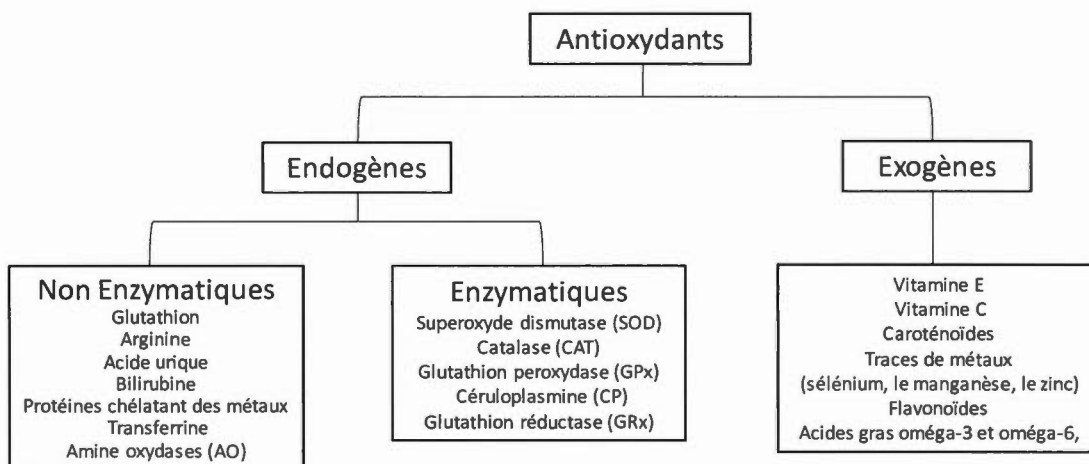
### **2.3 Des antioxydants**

La théorie des radicaux libres d'oxygène a été connue il y a environ cinquante ans (Gerschman et al, 1954, Valko et al, 2007; Kumar et al, 2017). Cependant, seulement dans les trois dernières décennies, leur rôle dans le développement des maladies, et également des effets protecteurs de la santé des antioxydants ont été montrés. En effet, l'augmentation du stress oxydatif se traduit en l'élévation du risque de l'incidence de pathologies qui constituent les principales causes de mort au niveau mondial comme des cancers, des maladies cardiovasculaires et des maladies neurodégénératives autant aiguës (ischémiques, traumatismes) que chroniques (sclérose latérale amyotrophique, maladie d'Alzheimer, maladie de Parkinson, maladie de Huntington) (Kumar et al, 2017; Pham-Huy et al, 2008).

Le terme antioxydant peut être défini de multiples façons, mais pour des systèmes biologiques le concept d'antioxydant se réfère à tout composé qui retarde, empêche ou supprime les dommages oxydatifs à une molécule cible ou à un substrat oxydable (Halliwell et al, 1995). Les fonctions antioxydantes impliquent une réduction du stress oxydatif, des mutations d'ADN, des transformations malignes, ainsi que d'autres lésions cellulaires.

Les mécanismes de défense antioxydante contre les dommages oxydatifs identifiés comprennent : (i) des mécanismes de prévention, (ii) des mécanismes de réparation, et (iii) les défenses antioxydantes (Valko et al, 2007). Les antioxydants générés dans l'organisme sont considérés comme antioxydants endogènes et ceux qui sont fournis

de l'extérieur à travers les aliments sont souvent classifiés comme antioxydants exogènes (Fig. 2.2).



**Figure 2.2** Antioxydants endogènes et exogènes (d'après Halliwell et al, 2007).

Des composés endogènes peuvent être classés aussi comme des antioxydants enzymatiques et des antioxydants non enzymatiques (Pham-Huy et al, 2008). Les principales enzymes antioxydantes directement impliquées dans la neutralisation des EROs et d'autres espèces radicalaires sont la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT), le glutathion peroxydase (GPx), la céruoplasmine (CP), la glutathion réductase (GRx) (Halliwell et al, 2007) et les amine oxydases (Mateescu et al, 1997)

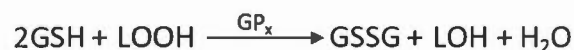
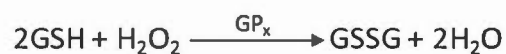
Les antioxydants non enzymatiques sont divisés en antioxydants métaboliques et aussi des nutriments antioxydants. Les antioxydants métaboliques appartenant aux antioxydants endogènes sont produits par le métabolisme dans le corps. Entre eux, les plus connus sont le glutathion, la L-arginine, l'acide urique, la bilirubine et les protéines chélatantes des métaux, la transferrine, etc. (Willcox et al, 2004). Des nutriments antioxydants, appartenant à des antioxydants exogènes, sont des composés qui ne peuvent pas être synthétisés dans l'organisme et doivent être fournis par l'intermédiaire des aliments ou des suppléments : tels que la vitamine E, la vitamine C, les caroténoïdes, des traces de métaux (sélénium, le manganèse, le zinc), les flavonoïdes,

les acides gras oméga-3 et les acides gras oméga-6, entre autres (Carocho et al, 2013). Les rôles physiologiques des antioxydants de certains de ces molécules seront discutés en détail.

### 2.3.1 Des antioxydants endogènes

#### *-Glutathion et glutathion peroxydase*

Les glutathion peroxydases (GPx) sont des enzymes tétramériques à sélénium qui se trouvent autant dans le cytoplasme que dans la mitochondrie cellulaire. Les GPx ont la capacité de réduire le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en H<sub>2</sub>O en utilisant les capacités réductrices du couple Glutathion/Glutathion disulfure (GSH/GSSG).

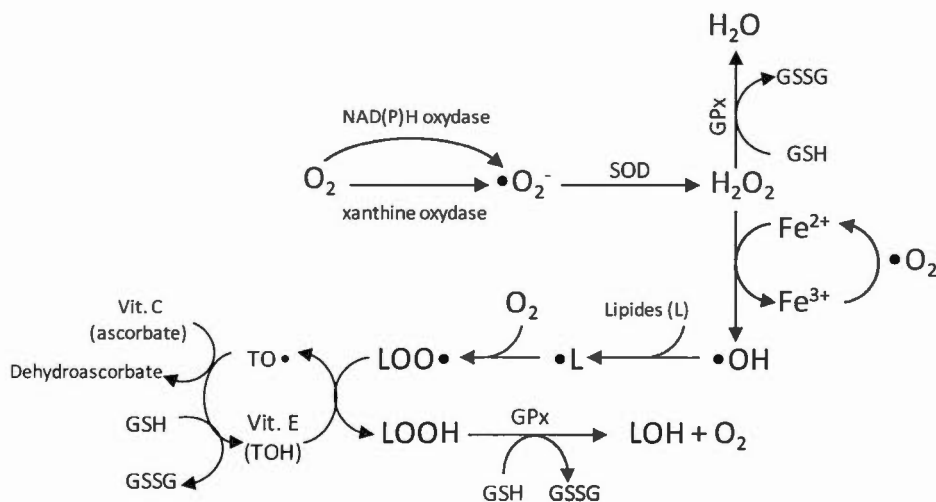


Le GSH est un tripeptide ( $\gamma$ -L-Glutamyl-L-cystéinyglycine) formé par la condensation d'acide glutamique, avec de la cystéine et de la glycine. Il est synthétisé dans le cytosol par l'action séquentielle de la glutamate-cystéine ligase et le glutathion synthétase. (Valko et al, 2007).

Le glutathion intervient dans le maintien du potentiel redox du cytoplasme de la cellule. Il intervient aussi dans un certain nombre de réactions de détoxification et d'élimination d'EROs. Pratiquement toutes les cellules en contiennent une concentration élevée (1 et 15 mM) (Valko et al, 2007). Le glutathion oxydé est accumulé à l'intérieur des cellules et le rapport GSH / GSSG est une bonne mesure du stress oxydatif d'un organisme (Masella et al, 2005). GSSG formé continuellement est réduit en GSH par le glutathion réductase en présence de NADPH.

Les principales fonctions de protection contre le stress oxydatif du glutathion (Fig. 2.3) sont (Masella et al, 2005) : (i) cofacteur des enzymes qui ont des fonctions détoxifiantes

contre le stress oxydatif (ex : glutathion peroxydase (GPx), le glutathione transferase); (ii) piègeur direct de l'oxygène singulet et du radical hydroxyle; (iii) détoxification du peroxyde d'hydrogène et des peroxydes lipidiques par l'action catalytique du glutathion peroxydase; (iv) GSH est capable de régénérer à leurs formes actives les vitamines C et E par la réduction du radical de vitamine E (TO•) en présence de vitamine C. La capacité de glutathion de régénérer des antioxydants est liée avec l'état redox du couple-glutathion disulfures glutathion (GSSG / 2GSH) (Pastore et al, 2003).



**Figure 2.3** Les principales fonctions de protection du glutathion contre le stress oxydatif (d'après Valko et al, 2007).

#### -La catalase

La catalase (CAT) est une enzyme présente dans les cellules des animaux, plantes ainsi que dans les bactéries anaérobies. Même si la CAT est présente dans tous les tissus et organes, sa concentration est spécialement élevée dans le foie et les érythrocytes (Sung et al, 2013). Cependant, la CAT est localisée exclusivement dans une organelle connue comme peroxysome, ce qui limite son action par rapport à d'autres enzymes, par exemple cytoplasmiques (Swaran, 2009). Cet enzyme transforme le  $H_2O_2$  en oxygène moléculaire et en  $H_2O$ .



*-Enzymes à cuivre : la céruloplasmine (CP) et les amine oxydases*

La céruloplasmine (CP) et les amine oxydases (AO) sont des protéines à cuivre, multifonctionnelles qui jouent différents rôles dans l'organisme. Entre les rôles classiquement acceptés pour la CP (132 kDa) se trouvent : le transport du cuivre, son activité comme oxydase des amines biogènes et comme ferroxidase régulatrice du métabolisme du fer. Les AO sont une classe intéressante d'enzymes qui sont regroupés en deux classes : EC 1.4.3.6 et EC 1.4.3.13. La classe EC 1.4.3.6 comprend entre autres des amines oxydases présentes dans le plasma sanguin de mammifères : amine oxydase sérique (SAO) et la diamine oxydase (DAO) (Buffoni et al, 2000). Elles sont des enzymes oxydoréductases qui participent dans différentes voies métaboliques en catalysant l'oxydation d'une large gamme d'amines biogènes comprenant de nombreux neurotransmetteurs, histamine, amines et xénobiotiques (Mondovi et al, 1990). Les AO catalysent l'oxydation des amines primaires en aldéhydes, avec la libération subséquente d'ammoniac et de peroxyde d'hydrogène.

L'activité antioxydante de la CP a été démontrée dans différentes études (Atanasiu et al, 1998; Dumoulin et al, 1996). La capacité de piéger certains EROs tels que les radicaux superoxydes ( $\bullet\text{O}_2^-$ ) et les radicaux hydroxyles ( $\bullet\text{OH}$ ) par la CP a été montrée dans ces études. En effet, la CP catalyse la dismutation des radicaux  $\bullet\text{O}_2^-$  (Goldstein et al, 1979). En présence de glutathion, la CP peut réagir avec le  $\text{H}_2\text{O}_2$  de manière stoechiométrique (Paradis et al, 2010). Aussi, le rôle protecteur de la CP dans divers tissus sous stress oxydatif a été mis en évidence à travers plusieurs études qui ont montré la capacité protectrice de la CP contre les radicaux libres (Mateescu et al, 1995).

Également, d'autres études ont signalé les effets antioxydants *in vitro* et *ex vivo* de l'aminé oxydase sérique (SAO) contre les radicaux libres de l'oxygène ( $\bullet\text{O}_2^-$ ,  $\bullet\text{OH}$ ,  $^1\text{O}_2$ ) et leurs sous-produits ( $\text{H}_2\text{O}_2$ , HOCl). Ces études ont montré que cette capacité de

piégeage des EROs confère à la SAO non seulement une capacité antioxydante, mais aussi apparaît comme étant un agent cardioprotecteur efficace contre les lésions myocardiques générées par les EROs similaires à la CP (Mateescu et al, 1997).

### **2.3.2 Des antioxydants exogènes**

#### *- Vitamine E et Trolox®*

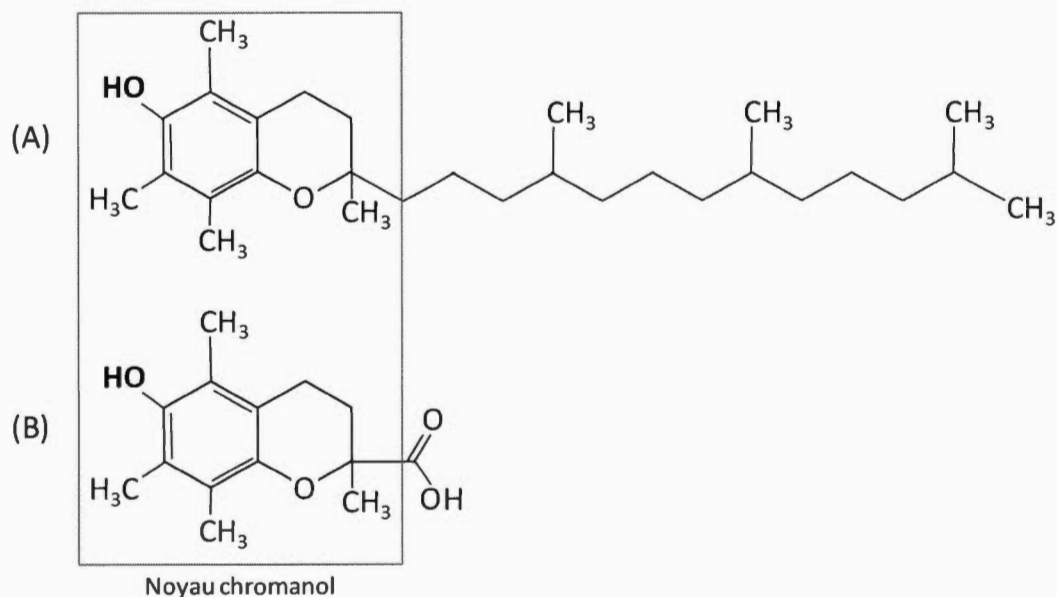
La vitamine E (alpha-tocophérol) est le principal antioxydant coupeur de chaîne radicalaire dans le corps (Traber et al, 2007). Elle est considérée comme la principale ligne de défense contre la peroxydation lipidique, protégeant la membrane cellulaire de l'attaque des radicaux libres. Il a été rapporté que la vitamine E peut avoir un rôle protecteur dans la prévention ou minimisation des dommages causés par les radicaux libres reliés aux maladies cardiovasculaires, cancer, cataractes, entre autres (Cadenas et al, 1996).

La molécule de vitamine E (Fig. 2.4 A) peut être divisée en deux parties : un noyau chromanol qui est responsable de ses propriétés antioxydantes et une chaîne latérale saturée à 16 atomes de carbone (Rezk et al, 2004). Le Trolox® (Fig. 2.4 B) est structurellement similaire, présentant le même noyau chromanol mais la chaîne latérale a été substituée par un groupe carboxyle.

Le Trolox® (acide-6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylique) est un dérivé synthétique hydrosoluble dont la structure moléculaire cyclique est similaire à celle de la vitamine E. Il est souvent utilisé comme standard dans différentes méthodes d'évaluation des propriétés antioxydantes.

Parmi les analogues de la vitamine E utilisés dans les études d'oxydation, le Trolox® présente certains avantages; notamment par sa solubilité modérée en eau il peut être ajouté directement au système d'étude intact. Cela facilite les études sur les systèmes

biologiques naturels et les études quantitatives sur les systèmes modèles (Ross et al, 1995).



**Figure 2.4** Structure de la molécule de vitamine E (A) et du Trolox® (B). Le noyau chromanol est responsable de ses propriétés antioxydantes pendant que la chaîne latérale des structures décide la polarité des molécules (d'après Rezk et al, 2004).

La vitamine E et le Trolox® fonctionnent de façon similaire comme antioxydants en raison de leur capacité à donner l'hydrogène du groupe hydroxyle (Fig. 2.4 A,B) au radical peroxyde ( $\text{LOO}\cdot$ ) en le transformant en peroxyde lipidique (Fig. 2.3) et laissant un électron non apparié sur l'oxygène, soit le radical  $\alpha$ -tocophéryl ( $\alpha\text{-TO}\cdot$ ) (Lucio et al, 2004). Ensuite, la vitamine E est régénérée par la vitamine C qui est elle-même régénérée par des enzymes, les ascorbate réductases (Packer 1991).

#### - Acide ascorbique

L'acide ascorbique (vitamine C) est l'un des plus communs antioxydants hydrosolubles (Pisoschi et al, 2015). Bien que l'acide ascorbique n'est pas capable de piéger des

radicaux lipophiles directement, il a un effet synergique avec l'action antioxydante du tocophérol pendant l'élimination des radicaux peroxydes (Du et al, 2012).

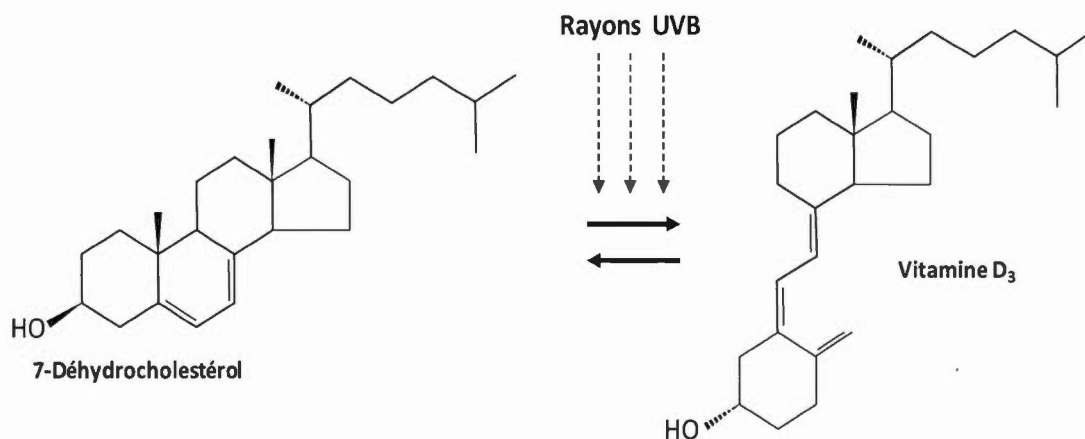
Également, la vitamine C est connue pour jouer en rôle essentiel comme antioxydant en protégeant la membrane phospholipidique des dommages causés par la peroxydation. La capacité de piégeage de radicaux libres de la vitamine C a été démontrée dans le cerveau (May et al, 2012; Padh,1990; Englard et al, 1986) et une capacité neuroprotectrice a été attribuée à cette vitamine (Spector, 2014; May et al, 2012). Aussi, la vitamine C est capable de piéger les radicaux hydroxyles, alcoxyles et superoxydes dans des systèmes biologiques, ainsi que des espèces réactives d'azote par la formation de l'acide déshydroascorbique en prévenant l'oxydation des biomolécules essentielles (Descamps-Latscha et al, 2001; Du et al, 2012).

#### *- Vitamine D*

La vitamine D est un groupe de stéroïdes liposolubles. Elle est synthétisée dans l'épiderme des animaux à partir de l'incidence des rayonnements solaires UVB (280-315 nm) sur le 7-déhydrocholestérol (Fig. 2.5). Les deux formes plus importantes de vitamine D chez les mammifères sont la vitamine D<sub>2</sub> (ergocalciférol) et la vitamine D<sub>3</sub> (cholécalférol) (Lehninger et al, 1994). Ces deux formes sont les précurseurs biologiques du 1,25-dihydroxycholécalférol qui possède une action du type hormonal, en activant la fixation et le transport du calcium dans l'intestin et les os (Lehninger et al, 1994). Un autre rôle classique de la vitamine D est de maintenir l'homéostasie du phosphore qui est étroitement liée à celle du calcium.

En plus, la vitamine D, comme antioxydante, a la capacité d'inhiber la peroxydation lipidique dépendant du fer (Bao et al, 2008; Winseman, 1993). De nouvelles fonctions ont été proposées pour la vitamine D comme la prévention de certains types des cancers, les diabètes mellitus type I et type II ou des maladies cardiovasculaires (Battault et al, 2013).





**Figure 2.5** Synthèse de la vitamine D<sub>3</sub> à partir du 7-Déhydrocholestérol (d'après Lehninger et al, 1994).

#### 2.4 Méthodes d'évaluation des activités antioxydantes

La plupart des antioxydants, endogènes ou exogènes, ont la capacité de piéger les radicaux libres par deux mécanismes différents : transfert d'atomes d'hydrogène (TAH) et par transfert d'électrons (TE) (Apak et al, 2016). Il existe une large liste croissante des tests pour déterminer l'activité antioxydante d'une substance *in vitro*. Ils ont été divisés en deux catégories sur la base de ces deux mécanismes d'inactivation ou piégeage.

Les tests basés sur TAH mesurent la capacité d'un antioxydant à éliminer les radicaux libres par le don d'hydrogène (H) pour former des composés stables (Prior et al, 2005). La réactivité relative dans les essais TAH est déterminée par l'énergie de dissociation des liaisons hydrogène du groupe donneur de H dans l'antioxydant potentiel et le potentiel d'ionisation (Prior et al, 2005). Ces types de tests sont généralement composés d'un antioxydant (AH) et d'un générateur de radicaux libres synthétiques (X•) comme les radicaux ABTS• (sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonique) (Konan et al, 2016) ou le radical libre DPPH• (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) qui est recommandé pour des composés contenant des groupes SH-, NH- et OH- (Huang et al, 2005).



Les tests à base de TE mesurent la capacité d'un antioxydant de réduire un oxydant par le don d'électrons. Pour ce type d'essais, une seule réaction redox est souvent utilisée et normalement l'oxydant est utilisé comme indicateur du point final de la réaction (Huang et al, 2005). Le degré de changement de couleur est proportionnel à la concentration antioxydante (Apak et al, 2016) . De nombreux tests antioxydants courants sont basés sur ce principe, y compris teneur totale en composés phénoliques (TTCP), pouvoir de réduction des ions ferriques (PRIF), dosage de réduction de cuivre (CUPRAC), capacité antioxydante équivalente de Trolox (TEAC) (Tabart et al, 2009) et test colorimétrique N,N-diéthyl-p-phénylènediamine (DEPDA).



Compte tenu de la complexité des processus d'oxydation et de la nature diversifiée des antioxydants, avec des composants à la fois hydrophiles et hydrophobes, il n'y a pas une méthode universelle par laquelle l'activité antioxydante peut être mesurée quantitativement d'une façon bien précise. Le plus souvent, il faut combiner les réponses de différents tests et complémentaires pour avoir une indication sur la capacité antioxydante de l'échantillon à tester (Niki, 2010).

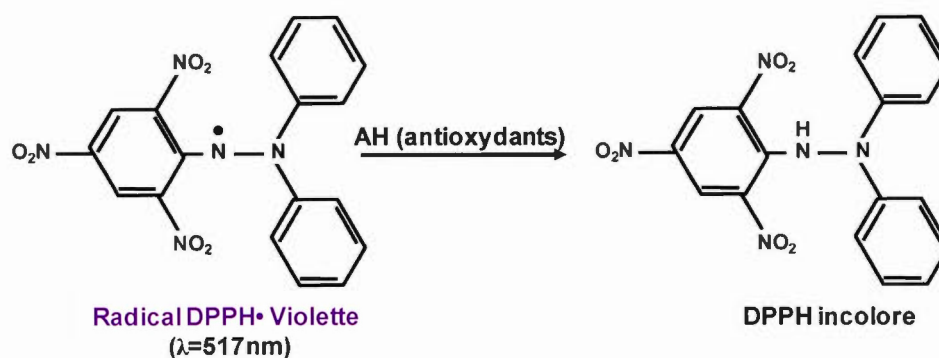
Si bien les tests *in vitro* sont amplement utilisés en raison de leur simplicité, leur grande vitesse et leur sensibilité, il faut tenir compte aussi de leurs limitations. Ainsi, les essais fréquemment utilisés ont souvent de problèmes soit pour bien établir le point final de la réaction, soit parce que la sensibilité à la lumière des réactifs utilisés affecte les résultats obtenus (Schaich, 2015). D'autre part, concernant les fluides biologiques, étant donné que la plupart des antioxydants sont mal absorbés ou sont rapidement conjugués et éliminés dans l'urine, les concentrations antioxydantes utilisées pour

obtenir une réponse dans ces essais *in vitro* sont des ordres de grandeur supérieurs à ceux qui seraient jamais circulant dans l'organisme (Frankel, 2007).

Une limitation conceptuelle vient du fait que les conditions utilisées pour les tests antioxydants *in vitro* ne sont pas comparables à celles des systèmes biologiques donc la capacité de piégeage des radicaux observée *in vitro* probablement ne soit pas observée *in vivo*. Une deuxième limitation conceptuelle est que la chimie et les cibles moléculaires de la plupart des essais *in vitro* ne sont pas pertinentes pour les conditions *in vivo*. Différents tests utilisent, en tant que cibles, des radicaux stables à contrainte stérique (ex.  $\bullet\text{ABTS}^+$  ou  $\bullet\text{DPPH}$ ) qui suivent des temps de réaction beaucoup plus longs que les radicaux actifs de courte durée de vie trouvés *in vivo* comme  $\bullet\text{O}_2^-$ ,  $\bullet\text{OH}$  ou des radicaux formés par l'oxydation des lipides (Jimenez-Alvarez et al, 2008).

#### 2.4.1 Méthode colorimétrique 2,2-Diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH).

Le 2,2-Diphényl-1-picrylhydrazyl est un radical libre stable (DPPH $\bullet$ ) qui persiste pendant des heures en solution aqueuse. Il présente une absorbance maximale à une longueur d'onde de 517 nm. En présence d'un substrat pouvant donner un atome d'hydrogène (Fig. 2.6), le DPPH  $\bullet$  est réduit en perdant sa couleur violette (Mishra et al, 2012).

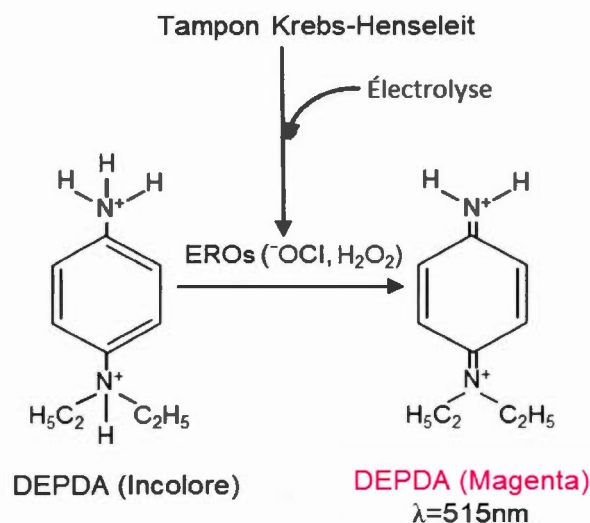


**Figure 2.6** Principe de la méthode colorimétrique DPPH. En présence d'un substrat pouvant donner un atome d'hydrogène, le DPPH  $\bullet$  est réduit en perdant sa couleur violette.

Le piégeage du radical libre DPPH• est fait apparemment en deux étapes: (i) une étape rapide consistant essentiellement en l'abstraction des atomes de H les plus labiles de l'antioxydant; et (ii) une étape lente reflétant une activité restante sur les produits d'oxydation/dégradation dérivés de la première étape (Mishra et al, 2012; Zou et al, 2016).

#### 2.4.2 Méthode colorimétrique DEPDA (Diéthyl-p-phénylènediamine).

Dans la méthode DEPDA, l'électrolyse de KH peut générer des radicaux libres d'oxygène (RLO) tels que l'anion superoxyde ( $\cdot\text{O}_2^-$ ), l'oxygène singulet ( $^1\text{O}_2$ ) et le radical hydroxyle ( $\cdot\text{OH}$ ) et leurs sous-produits : peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) et l'ion hypochlorite ( $\text{OCl}^-$ ) (Jackson et al, 1986). Pratiquement, les EROs mesurés par ce test sont le  $\text{H}_2\text{O}_2$  et l'ion  $\text{OCl}^-$  car les RLOs sont très instables avec une durée de vie inférieure aux dix secondes (Jackson et al, 1986). Les EROs générés peuvent être quantifiés à partir de la réaction d'oxydation du DEPDA (Fig. 2.7). Le forme oxydé de DEPDA présente une couleur magenta absorbant à 515 nm.



**Figure 2.7** Principe de la méthode colorimétrique DEPDA. Les EROs générés par électrolyse du KH peuvent être quantifiés à partir de la réaction d'oxydation du DEPDA (d'après Alberti et al, 2000)

En présence d'un antioxydant, l'oxydation du chromogène n'est pas possible, ce qui entraîne la décoloration de la solution. La fin de la réaction est généralement établie entre le 30 secondes et trois minutes. Cependant, la cinétique de réaction de l'antioxydant étudié doit être examinée préalablement pour déterminer la fin de réaction (Alberti et al, 2000)

## CHAPITRE III

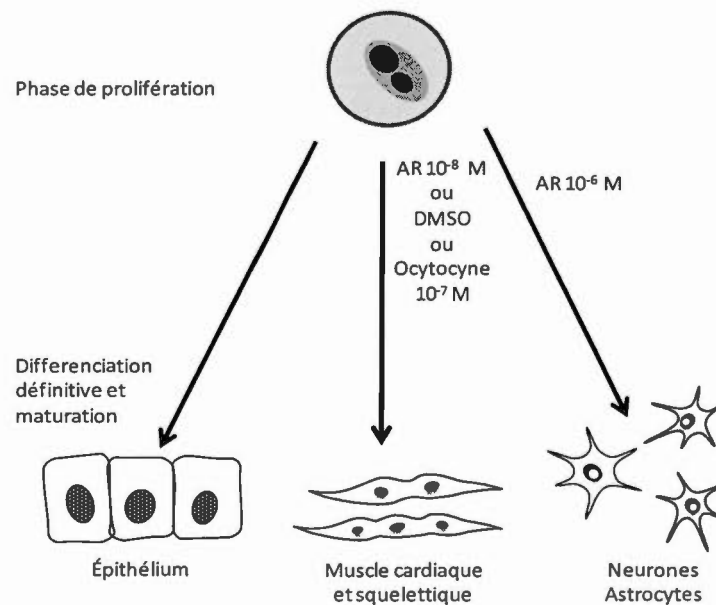
### LE MODÈLE CELLULAIRE P19 POUR L'ÉVALUATION DES PROTECTEURS ANTIOXYDANTS

#### **3.1 Origine et caractéristiques générales**

Le modèle cellulaire P19 a été développé par le Dr McBurney à l'Université d'Ottawa (2003). Les cellules-souches P19 sont une lignée de cellules de carcinome embryonnaire de souris. Elles ont été isolées d'un tératocarcinome formé à la suite de la transplantation d'un embryon de 7.5 jours dans le testicule d'une souris juste avant l'initiation de la différenciation cellulaire. Des cultures cellulaires contenant des P19 indifférenciées ont été établies directement à partir de la tumeur primaire de l'embryon transplanté. Les cellules P19 non différenciées peuvent proliférer de façon rapide et indéfiniment et sont génétiquement très stables, car elles présentent un caryotype euploïde mâle normal (McBurney, 2003).

Comme d'autres carcinomes et cellules souches embryonnaires, les P19 se développent de manière plastique et elles se différencient en dérivées cellulaires de trois feuillets embryonnaires en utilisant les mêmes mécanismes que les cellules embryonnaires normales (McBurney, 2003). Elles sont dites multipotentes car elles ont la capacité de se différencier en plusieurs types cellulaires. La différenciation des cellules P19 peut être induite si les agrégats sont exposés à des concentrations non toxiques de différents inducteurs (Molski et al, 2006).

L'activation de différents facteurs de transcription cardiogéniques comme : GATA-4 et Nkx-2.5 par le diméthylsulfoxyde (DMSO) ou par l'hormone peptidique ocytocine conduit à la différenciation des cellules souches en cellules cardiaques (McBurney, 2003; Paquin et al, 2002). Ainsi, la différenciation des cellules P19 en neurones a lieu lorsqu'elles sont mises en présence d'acide rétinoïque (AR) à des concentrations plus grandes que  $10^{-6}$  M (McBurney, 2003). Les mêmes concentrations d'AR administrées tardivement génèrent des cellules musculaires (Fig. 3.1) (Bouchard et al, 2009).

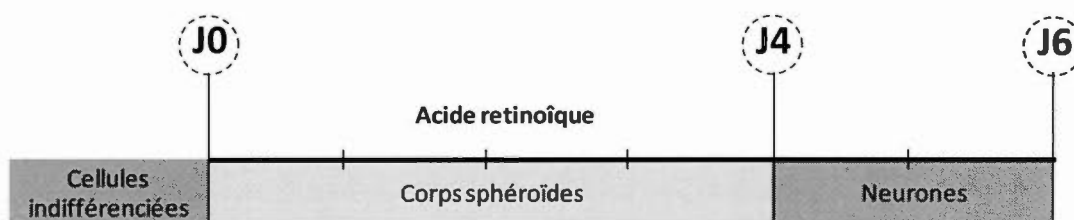


**Figure 3.1** Différents inducteurs à des concentrations non toxiques pour la différenciation des cellules P19 (d'après Rudnicki et al, 1987).

### 3.2 Différenciation neuronale

-Les caractéristiques des cellules P19 fournissent un excellent modèle de différenciation cellulaire. La première étape de la différenciation neuronale est la culture des cellules P19 pendant 4 jours en présence d'AR  $0,5 \mu\text{M}$ . L'AR se lie aux récepteurs nucléaires en activant la transcription de gènes cibles pour induire la différenciation neuronale (McBurney, 2003).

Du jour 0 (J0) au jour 4 (J4), les cellules sont cultivées en corps sphéroïdes flottants ou corps embryoïdes dans des pétris bactériologiques (Fig. 3.2). À partir du J4 l'action de l'AR est arrêtée et les corps embryoïdes sont dissociés en cellules individuelles, qui sont transférées dans des pétris de grade tissulaire. Durant les 24h suivantes, les cellules vont étendre des neurites qui seront visibles au bout de deux jours suivants (J6 de la différenciation). La maturation des neurones va continuer de façon semblable au système nerveux central (SNC). En fait, plusieurs phénotypes des neurones nouvellement différenciés présentent des caractéristiques comparables aux populations neuronales normales du néocortex, de l'hippocampe et du striatum. Au-delà de J8-J10, des fibroblastes et des astrocytes apparaissent (Cadet et al, 2000; MacPherson et al, 1995).



**Figure 3.2** Différenciation des cellules P19 en neurones en présence d'acide rétinoïque. La première étape de la différenciation neuronale est la culture des cellules P19 pendant 4 en présence d'AR 0,5  $\mu$ M (d'après Ducharme et al, 2010).

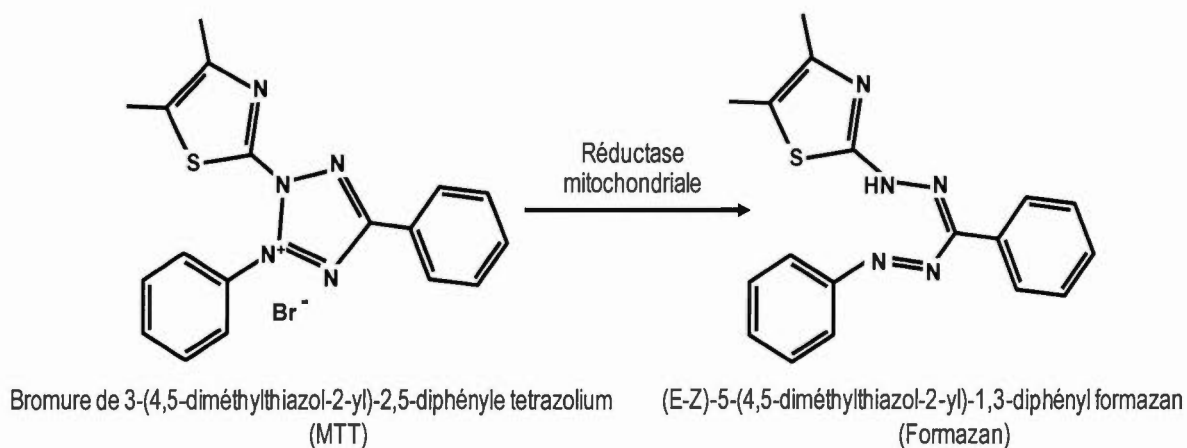
### 3.3 Les mesures de viabilité sur des neurones P19 en présence des protéines à cuivre

Les tests à base de sel de tétrazolium sont devenus les essais standards pour mesurer la viabilité ou la prolifération cellulaire depuis leur conception par Mosmann dans les années 1980 (Berridge et al, 1996, Mosmann, 1983). Entre les tests à base de tétrazolium le plus souvent utilisés se trouve le MTT (bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényle tétrazolium) et le XTT (Hydroxyde de 2,3bis



(2-méthoxy- 4-nitro-5-sulfophényl) -5- ((phénylamine) carbonyle) -2H-tétrazolium). Ces essais mesurent la viabilité cellulaire en termes d'activité réductrice des cellules viables. Ainsi, les réductases présentes dans les mitochondries et d'autres organites dans les cellules actives métaboliquement vont réduire le sel tétrazolium en cristaux de formazan insolubles dans l'eau (Stockert et al, 2012). Les cristaux de formazan (violets) peuvent être solubilisés dans du DMSO permettant la quantification des moyens spectrophotométriques (Fig. 3.3).

Ces tests sont simples, faciles, rapides, non radioactifs et fonctionnent avec des cellules viables actives métaboliquement. Cependant, une analyse documentaire approfondie révèle que plusieurs tests de sel de tétrazolium peuvent être influencés par une variété de paramètres et de produits chimiques. Par exemple, le XTT peut être réduit par NADPH, le mercaptoéthanol, le glutathion réduit et la L-cystéine en absence de cellules (York et al, 1998; Vistica et al, 1991). Aussi, l'albumine de sérum humain peut réduire les sels de tétrazolium MTT et XTT (Instruments et al, 2007).



**Figure 3.3** Principe du test à base de sel de tétrazolium. Les réductases présentes dans les mitochondries et d'autres organites dans les cellules métaboliquement actives vont réduire le sel tétrazolium en cristaux de formazan (d'après Riss et al, 2016).

Encore, le MTT peut être réduit par de nombreux composés phytochimiques qui montrent un potentiel réducteur intrinsèque dont les antioxydants (Burgisser et al, 2002; Natarajan et al, 2000) et les polyphénols (Wang et al, 2006), les produits de corrosion de certains alliages métalliques (Fischer et al, 2010), les flavonoïdes (Peng et al, 2005; Talorete et al, 2006) ou les vitamines A et C (Chakrabarti et al, 2001).

Le test Rouge Neutre (RN) fournit l'estimation quantitative du nombre de cellules viables dans une culture. Il est aussi assez souvent utilisé pour des tests de cytotoxicité avec de nombreuses applications biomédicales et environnementales. L'analyse à RN peut être faite grâce à l'accumulation intracellulaire du colorant dans les lysosomes cellulaires via le transport actif. Le colorant est ensuite extrait des cellules viables en utilisant une solution d'éthanol acidifié et la quantification se réalise à l'aide d'un spectrophotomètre. Le colorant présente une charge nette proche de zéro au pH physiologique, lui permettant de pénétrer les membranes de la cellule (Repeto et al, 2008). Le RN est un essai simple, rapide qui permet maintenir les cellules viables après avoir conclu l'analyse, donc il est possible de continuer l'étude de la culture cellulaire par d'autres méthodes ou continuer d'appliquer des traitements aux cellules.

## CHAPITRE IV

### PRÉSENTATION DU PROJET DE MAÎTRISE

Les antioxydants sont des composés qui retardent, empêchent ou suppriment les dommages oxydatifs d'une molécule cible ou d'un substrat oxydable. Les fonctions des antioxydants impliquent une réduction du stress oxydatif, des mutations d'ADN, des transformations malignes, ainsi que d'autres lésions cellulaires diminuant le risque de développer différentes pathologies. Pour cela, plusieurs recherches sont dédiées à trouver nouveaux agents antioxydants et à l'étude de leurs effets dans les organismes vivants.

Ainsi, des études préalables de l'équipe ont montré que l'urée et certains de ses dérivés peuvent être considérés comme agents antioxydants et cardioprotecteurs (Wang et al, 1999). D'autres ont signalé que l'urée en tant qu'antioxydant, est capable de protéger des organes vitaux (le foie, le cœur) de la peroxydation des lipides. En plus, l'urée semble présenter plusieurs avantages en raison de sa faible masse moléculaire et de la mobilité qu'elle présente dans le système biologique.

D'autre part, des travaux réalisés en collaboration entre les équipes du Dr M.A. Mateescu et Dr J. Paquin, ont montré que des antioxydants, dont des protéines à cuivre, exercent des effets cardioprotecteurs ou agissent comme agents neuromodulateurs. Cependant, certaines propriétés de ces agents telles que la cytotoxicité, l'activité pro-oxydante ou de masses moléculaires élevées limitent leur application. Dans ce

contexte, des complexes d'urée et de biuret avec cuivre (II) ont été considérés dans le présent projet comme une alternative aux limitations des protéines à cuivre.

Pour déterminer la capacité antioxydante d'un composé, les tests *in vitro*, DPPH et DEPDA, sont amplement utilisés en raison de leur simplicité, leur grande vitesse et leur sensibilité. Cependant, les conditions utilisées par ces tests ne sont pas comparables à celles retrouvées *in vivo*. Pour cela, il est conseillé d'évaluer de la biocompatibilité des antioxydants potentiels avant d'arriver aux conclusions sur leur possible action bénéfique sur les systèmes biologiques.

L'utilisation du modèle de cellules neuronales P19 est avantageuse, car elle permet l'étude des dommages induits par le stress oxydatif ainsi que l'évaluation de la capacité de protection des antioxydants potentiels. Aussi, le modèle peut être utilisé pour l'évaluation de la biocompatibilité des différentes molécules en d'étude à partir de mesurer l'impact sur la viabilité des cellules exposées à différents traitements. À noter que ce modèle avait déjà été utilisé pour tester des composés à cuivre (II) avec des acides aminés.

#### **4.1 Les objectifs du projet de maîtrise**

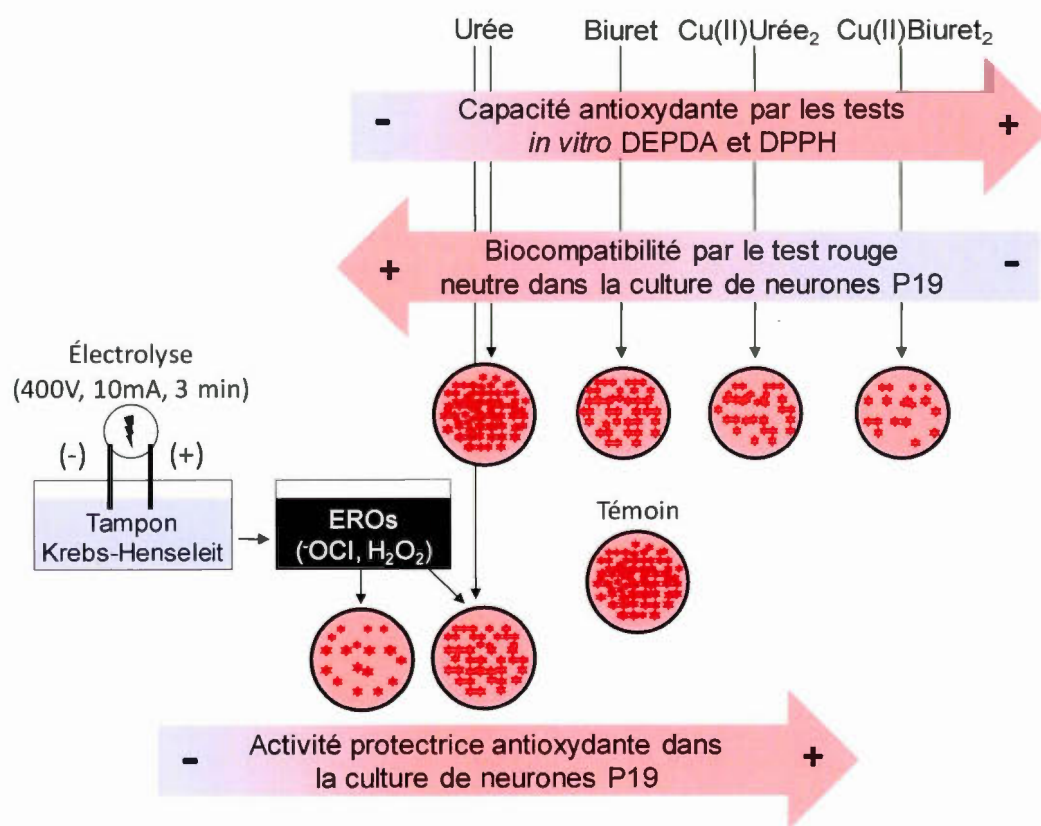
Le présent projet de maîtrise propose les objectifs suivants :

- 1- Produire des complexes cuivriques à base d'urée et de l'agent biuret.
- 2- Investiguer le rôle de l'urée, du biuret et des complexes cuivriques sur des cellules neuronales P19 en absence et en présence d'un stress oxydatif.
- 3- Élaborer une méthode améliorée basée le Rouge Neutre à la place du test MTT pour évaluer la viabilité des cellules neuronales P19 en présence des agents cuivriques

L'hypothèse principale était que l'urée, déjà montrée comme agent antioxydant et cardioprotecteur, pourrait jouer un rôle dans la neuroprotection. L'autre hypothèse était

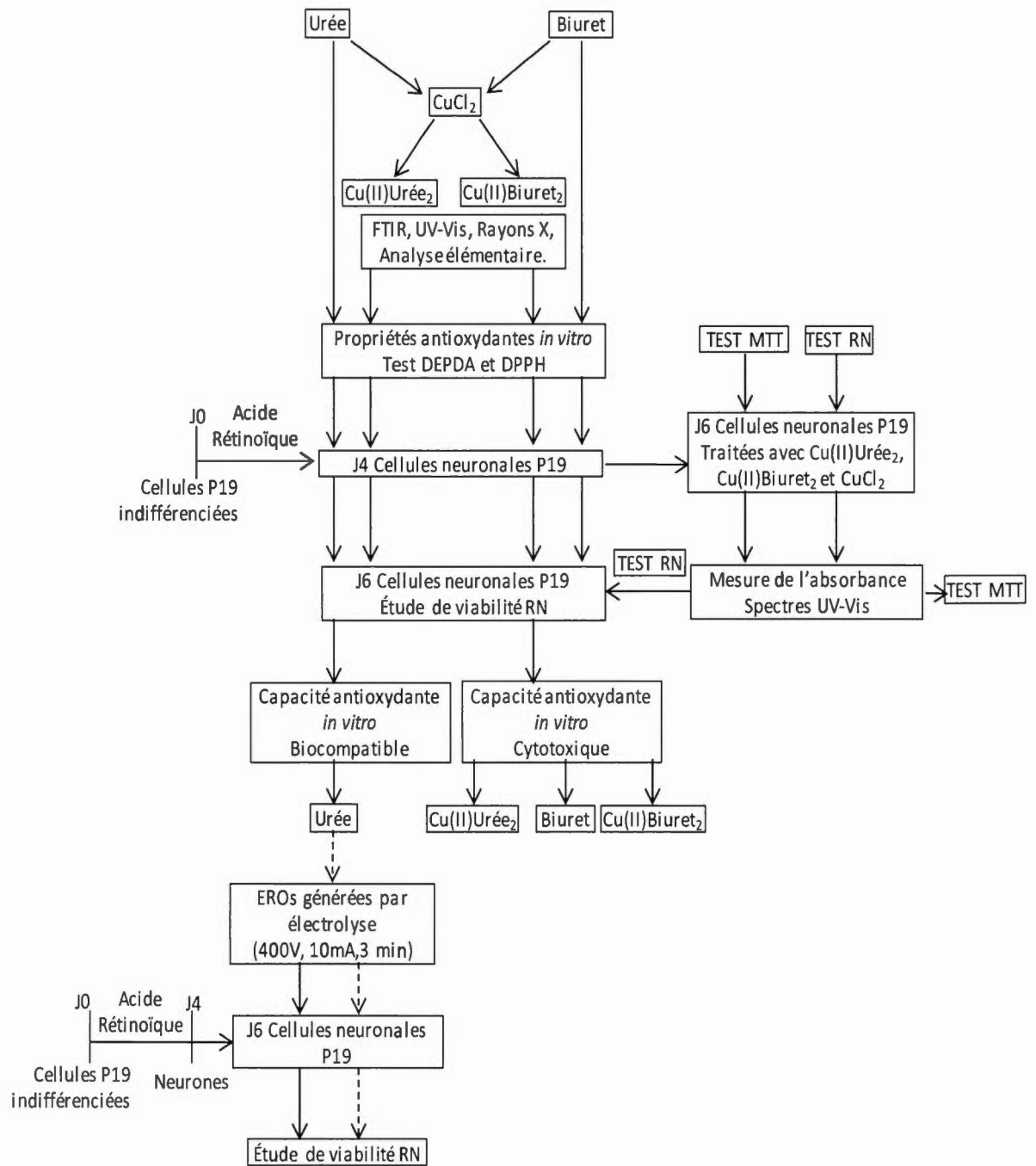
basée sur le fait que la céruloplasmine, enzyme à cuivre, avait un effet sur l'agrégation neuronale. En outre, nous avons émis l'hypothèse que les complexes à cuivre (II) à base de l'urée pourraient exercer un effet neuromodulateur et protecteur contre le stress oxydatif.

La figure 4.1 présente schématiquement l'avancement et les réalisations dans le projet de maîtrise :



**Figure 4.1** Présentation schématique de l'avancement et des réalisations du projet.

Un schéma-bloc des étapes et des accomplissements durant le projet de maîtrise est présenté dans la Figure 4.2.



**Figure 4.2** Présentation schématique des différentes étapes du projet.

**Principales réalisations : publications et communications, dans le cadre du projet de maîtrise :**

Neutral Red versus MTT assay of cell viability in the presence of copper compounds

Mariela Gomez Perez\*, Lyvia Fourcade, Mircea Alexandru Mateescu and Joanne Paquin

Analytical Biochemistry. 2017, 15; 43-46

Urea and its copper complexes as antioxidant protective agents (article soumis)

Mariela Gomez Perez\*, Joanne Paquin, Pompilia Ispas-Szabo and Mircea Alexandru Mateescu

Manuscrit en préparation pour soumission

Complexes de cuivre avec propriétés antioxydantes

Mariela Gomez Perez\*, Pompilia Ispas-Szabo, Mircea Alexandru Mateescu

84<sup>e</sup> Congrès de l'Acfas :

Université du Québec à Montréal : 9 au 13 mai 2016

Copper complexes with antioxidants properties

Mariela Gomez Perez\*, Pompilia Ispas-Szabo, Mircea Alexandru Mateescu

18th Annual Chemistry and Biochemistry Graduate Research Conference.

Université de Concordia : 20 Novembre 2015

Les contributions sont présentées en Annexe 1 du mémoire.

## CHAPITRE V

### L'URÉE ET SES COMPLEXES DE CUIVRE COMME AGENTS ANTIOXYDANTS ET NEUROPROTECTEURS

#### **Contribution de l'auteur principal et des co-auteurs**

##### **Auteure principale:**

**Mariela Gomez Perez:** Réalisation de la majeure partie de la rédaction, préparation de protocoles, réalisation des expériences, traitement des résultats et recherche bibliographique.

##### **Co-auteurs:**

**Joanne Paquin :** Participation à la rédaction et à la correction des manuscrits, coordination des travaux, élaboration du concept, supervision des expériences ainsi que l'analyse et traitement de résultats.

**Pompilia Ispas-Szabo:** Participation à la rédaction et à la correction des manuscrits, coordination des travaux, élaboration du concept, supervision des expériences ainsi que l'analyse et traitement de résultats (synthèse et caractérisation des complexes à cuivre).

**Mircea Alexandru Mateescu :** Direction du projet, participation à la rédaction et à la correction des manuscrits, coordination des travaux, élaboration du concept, supervision des expériences ainsi que l'analyse et traitement de résultats.



## 5.1 L'urée et ses complexes de cuivre comme agents antioxydants et neuroprotecteurs

Mariela Gomez Perez, Joanne Paquin, Pompilia Ispas-Szabo and  
Mircea Alexandru Mateescu\*  
Département de chimie et Centre de recherche BioMed, UQAM.

L'urée peut causer des risques pour l'homme et le bétail à une concentration élevée. Cependant, l'urée a précédemment été considérée comme antioxydante et comme agent cardioprotecteur, de manière similaire aux protéines de cuivre (céruloplasmine et amine oxydase). Ce rapport décrit l'impact de l'urée, du biuret et de leurs complexes de cuivre (II) :  $(\text{Cu(II)Urée}_2)$  et  $(\text{Cu(II)Biuret}_2)$  sur les cellules neuronales P19, concernant leurs propriétés antioxydantes. Les résultats ont montré que le  $(\text{Cu(II)Urée}_2)$  et le  $(\text{Cu(II)Biuret}_2)$  ont une activité antioxydante *in vitro* comparable à celle de l'urée et du biuret lorsqu'elle est testée avec du DPPH (1,1-diphényl-2,2-picrylhydrazyl) et DEPDA (N,N-diéthyl-p-phénylènediamine). En outre, il a été constaté que l'urée, dans une plage de concentration de 0,5 à 5 mM, a un effet protecteur sur les neurones P19 contre les dommages causés par les espèces réactives d'oxygène. L'urée a également présenté une bonne biocompatibilité en concentration jusqu'à 5 mM sur le modèle de cellules neuronales P19. Le biuret et les complexes à cuivre (II) présentaient une cytotoxicité modérée qui était cependant inférieure par rapport à celle des concentrations équivalentes de  $\text{CuCl}_2$ .

---

\*corresponding author : Mircea Alexandru Mateescu

## Urea and its copper complexes as antioxidant and protective agents

Mariela Gomez Perez, Joanne Paquin, Pompilia Ispas-Szabo and  
Mircea Alexandru Mateescu\*

Department of chemistry and Centre Biomed, UQAM

### Abstract

The nitrogenous fertilizer urea can cause human and livestock hazards at high concentrations. However, under physiological conditions, urea can act as an antioxidant and a cardioprotective agent similar to copper proteins. This report describes the impact of urea, biuret and their copper(II) complexes  $\text{Cu(II)Urea}_2$  and  $\text{Cu(II)Biuret}_2$  on the viability of mouse P19 neuronal cell cultures in relation to their *in vitro* antioxidant properties. Copper(II) complexes have an antioxidant activity comparable to that of urea and biuret when tested with DPPH (1,1-diphenyl-2,2-picrylhydrazyl) and DEPDA (N,N-diethyl-p-phenylenediamine) assays in the concentration range of 0.5 to 5 mM. However, although the cytotoxicity of copper(II) complexes and biuret was lower than that of equivalent concentrations of  $\text{CuCl}_2$ , only urea showed a good biocompatibility in concentrations up to 5 mM. Moreover, urea had a protective effect on neuronal cultures against the damage caused by reactive oxygen species. In conclusion, *in vitro* antioxidant activity does not necessarily predict biocompatibility, and urea antioxidant protective activity can extend to

**Keywords** : biuret, copper complexes, antioxidants, Neutral Red uptake cell viability assay, P19 neurons, electrolyzed Krebs Henseleit buffer, reactive oxygen species.

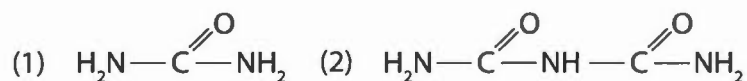
**Abbreviations** : DEPDA, N,N-diethyl-p-phenylenediamine; DPPH, Diphenyl-2,2-picrylhydrazyl; ELS, electrolyzed; HAT, hydrogen atom transfer; KH, modified Krebs-Henseleit ; NR, Neutral Red; PBS, phosphate buffer saline; ROS, reactive oxygen species; SET, single electron transfers; SGF, Simulated Gastric Fluid; SIF, Simulated Intestinal Fluid; SNB, supplemented Neurobasal; SNB(-AO), supplemented Neurobasal devoid of antioxidants.

-----  
\*corresponding author : Mircea Alexandru Mateescu

## Introduction

Urea is a highly polar organic molecule (scheme 1) largely used as a soil fertilizer, a component of animal diet and a low-cost source of nitrogen to promote growth. Moreover, it is used in various other fields such as cosmetics, pharmaceuticals, biomedical and chemical industries. Urea is also an endogenous product of the catabolism of proteins and amino acids, and is present at different concentrations in blood and various organs (Goodman et al, 2002; Duchesne et al, 2001).

In systemic circulation, urea at high concentration is considered as toxic and causes disturbances in many cellular processes (Burg et al, 2007). However, at low concentration, urea was found to offer protection to vital organs (brain, liver, heart) against damages due to lipid peroxidation (Lukash et al, 1980). Previous studies surprisingly showed urea acting as an antioxidant and a cardioprotective agent (Wang et al, 1999) and protector against oxidative injury in hyponatremia (Soupart et al, 2002). Considering the large incidence of urea in daily life, it was of interest to investigate its impact on neurons.



Scheme 1. Structure of urea (1) and of (2) biuret.

The biuret is often used together with urea in animal feeding as an excellent non-protein nitrogen additive having a better palatability compared with urea (Currier et al, 2004). It contains two acylamino groups and one imino group (Scheme 1), structure compatible with its use as a neutral ligand in various complexes mostly for structural studies or bioanalytical applications (i.e. biuret dosage of proteins). Complexes of rare earth metals (Minyu et al, 1986), actinide metals (Ning et al, 1986), and alkaline earth metals (Raptis et al, 2000) based on urea or biuret ligand have been described.

However, the complexes of transition metals such as copper with these ligands have been rarely reported (Pop et al, 2002).

Copper is an essential trace element that participates in several biological processes in all living organisms (Crisponi et al, 2010). It is mostly found under the cationic  $\text{Cu}^{2+}$  form as a component of copper-proteins (Bento et al, 2007). Free  $\text{Cu}^{2+}$  released upon copper homeostasis disturbance can become toxic by the rapid generation of reactive oxygen species (ROS) (Harris et al, 1996; Shim et al, 2003). Beneficial actions have been reported for several naturally occurring copper complexes (Deschamps et al, 2005). For instance, the copper-protein ceruloplasmin can act as an antioxidant and a cardioprotective agent (Dumoulin et al, 1996; Atanasiu et al, 1998). A neuromodulatory action has also been reported (Maltais et al, 2003, Ducharme et al, 2010) that is due to the presence of copper(II) in its structure (Bento et al, 2007; Ducharme et al, 2010). Beside ceruloplasmin, low molecular weight complex of copper(II) with histidine has been proposed for the treatment of Menkes disease, a copper absorption disorder (Deschamps et al, 2005).

Considering previous studies on urea and on copper-proteins as antioxidants, it was of interest to prepare copper(II) complexes with urea and biuret ligands. This report describes the antioxidant capacity of urea and biuret before and after complexation with copper(II) cations. Also investigated is the biocompatibility of these compounds with P19 neuronal cells cultured in normal and oxidative stress conditions.

## **Materials and Methods**

### Synthesis of copper complexes

All chemicals were reagent grade and were used without further purification.  $\text{Cu(II)Urea}_2$  complex was prepared using a 1:4 molar ratio of  $\text{CuCl}_2$ :urea and a 50:1 volume ratio of isopropanol: $\text{H}_2\text{O}$  (Pop et al, 2002). A cold solution of copper(II) chloride in isopropanol was added dropwise, on ice, to an aqueous urea solution.

The mixture was stirred on ice during 30 min. The resulting blue-green solid complex was filtered, washed with isopropanol and dried at room temperature. Cu(II)Biuret<sub>2</sub> was obtained in the same conditions.

#### Physico-chemical characterization

The content of carbon (C), hydrogen (H) and nitrogen (N) was determined by the Dynamic flash combustion method which is based on complete oxidation of samples using EAS1108, Fisons instruments SpA and ECS4010 Costech. Melting points were measured using open capillary tubes on a Gallen kamp melting point apparatus. The infrared (IR) spectra for the complexes and their ligand were recorded on a Thermo-Nicolet 6700 FTIR spectrophotometer (4000-400 cm<sup>-1</sup>) using potassium bromide pellets (2 mg/100 mg KBr).

Single crystals of Cu(II)Urea<sub>2</sub> were analyzed by X-ray diffraction with a Bruker Venture Metaljet diffractometer. The crystal was kept at 100°K during data collection. Using the Olex2 software (Dolomanov et al, 2009), the structure was solved with the XT structure solution program (Sheldrick, 2008) using Direct Methods and the XL (Sheldrick, 2015) refinement package using Least Squares minimization method. The samples were exposed to GaK $\alpha$  X-rays with a wavelength of 1.34 Å and analyzed by an angular range of 2 $\theta$  from 10.99 to 121.14 degrees. Data collection and refinement parameters are summarized in Table A 2.1.

Solution of 40 mM of Cu(II)Urea<sub>2</sub> and of Cu(II)Biuret<sub>2</sub> complexes were prepared in water, in physiological saline solution (0.9 % NaCl), in Simulated Gastric Fluid (SGF: HCl 0.26 %, NaCl 0.2 %, pH 1.2) and in Simulated Intestinal Fluid (SIF: KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.68 %, NaOH 0.0615 %, pH 7.2). The absorbance measurements (360-960 nm) were obtained using a Visible Ultrospec 100 pro Spectrophotometer.

### Antioxidants capacity

#### *DEPDA (N,N-diethyl-p-phenylenediamine) colorimetric method*

ROS were generated by electrolysis (10 mA, 400V, 3 min) of the modified Krebs-Henseleit (KH) buffer (in mM: NaCl 118, KCl 4.8, CaCl<sub>2</sub> 1.8, MgSO<sub>4</sub> 0.86, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2, NaHCO<sub>3</sub> 2.54, glucose 11 and EDTA 0.027). The electrolysis cell contained 2.7 mL of KH buffer in the presence of 0.3 mL of each studied component at different concentrations. A volume of 0.2 mL of the electrolyzed (ELS) solution (ELS KH buffer + complex or ligand) was then added to 0.8 mL of 25mg/ml DEPDA solution (Sigma-Aldrich). The oxidant species react rapidly with DEPDA generating an oxidation product with a specific absorbance at 515 nm (Wang et al, 1999; Moore et al, 1984). The antioxidant capacities of ligands and complexes were expressed as a percentage of ROS still remaining in the ELS solution and was calculated according to the following equation:

$$\%ROS = \left( \frac{A_{\text{sample}} - A_{0\%ROS}}{A_{100\%ROS} - A_{0\%ROS}} \right) \times 100$$

For instance, the absorbance (A) of KH solution with DEPDA was considered as a signal of none oxidative species in solution (0% ROS) and the absorbance of KH ELS buffer with DEPDA was considered as a signal of maximal amount of oxidative species in solution (100% ROS). The sample was KH ELS buffer + complex or ligand.

#### *1,1-Diphenyl-2,2-picrylhydrazyl (DPPH) assay.*

DPPH is a stable free radical (DPPH•) characterized with an absorption band at about 517 nm. In the presence of a substrate that can donate a hydrogen atom, DPPH is reduced losing its violet color. The DPPH assay was performed in Brand-Williams et al's conditions (1995) slightly modified by Manzocco et al (1998). A solution of 0.5 mM DPPH (Sigma-Aldrich) was prepared and its absorbance was approximately

0.7 at 517 nm. A volume of 0.2 mL of sample (copper(II) complexes or ligands) was added to 1.8 mL of DPPH solution. After 30 min, the absorbance was measured at 517 nm. The percentage of remaining DPPH radical is calculated as follows:

$$\%DPPH \bullet = \left( \frac{A_{br} - A_{ar}}{A_{br}} \right) \times 100$$

where  $A_{br}$  is the absorbance before reaction with the antioxidant (complex or ligand) and  $A_{ar}$  is the absorbance after reaction.

### Cell culture and treatments

Mouse P19 embryonic stem cells were differentiated to neurons by exposure to 0.5  $\mu$ M all-trans-retinoic acid for 4 days (Ducharme et al, 2010). On day 4, an amount of  $3.8 \times 10^5$  neurons were seeded in gelatinized 12 well-plates containing supplemented Neurobasal (SNB) medium [Neurobasal containing 2% v/v B27 supplement (Fisher Scientific, St-Laurent, QC, Canada), 0.5 mM L-glutamine, 50 U/mL penicillin and 50 U/mL streptomycin].

Neuron treatment with urea or biuret as well as with their copper(II) complexes and  $\text{CuCl}_2$  began on day 4, concomitantly with cell seeding into the SNB medium. The five studied agents were freshly prepared in the phosphate buffer saline (PBS) as stock solutions and added individually to the culture medium at the indicated final concentrations. After 48h of incubation, cultures were analyzed for cell viability. Control cultures contained only the cells in SNB medium.

Neuron viability was also studied under oxidative stress conditions. Neurons were grown ( $3.8 \times 10^5$  neurons per well) from day 4 to day 6 in SNB medium devoid of antioxidants (SNB(-AO)) using the “minus antioxidants” version of the B27 supplement (Fisher Scientific). Then two types of experiments were done on day 6. In the first type, day 6 cultures were incubated for different times in the following

conditions: half SNB(-AO) medium was replaced by an equal volume of normal (non-ELS) KH buffer or an equal volume of ELS (10 mA, 400V, 3 min) KH buffer, or the SNB(-AO) medium was completely replaced by normal KH buffer. In the second type of experiments, day 6 cultures were incubated for 3h in 50% SNB(-AO) medium and 50% of normal KH or KH ELS buffer containing different urea concentrations. In both types of experiments, the control cultures were kept in SNB(-AO) medium.

### Cell viability

Cell viability was determined by the Neutral Red (NR) uptake assay as described (Gomez et al, 2017)). One mL of freshly prepared NR solution (138  $\mu$ M in 20 mM HEPES 20, 140 mM NaCl, 4 mM KCl, 3 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM D-glucose, pH 7.2) was added to each culture well pre-washed delicately with PBS. After 2h incubation (37°C, 5% CO<sub>2</sub>), NR solution was removed and cultures washed rapidly with 1% formaldehyde-1% calcium chloride. Then, 1 mL of NR eluent (EtOH:H<sub>2</sub>O:acetic acid 50:49:1) was added to extract the NR from cells. After 10 min agitation at room temperature, the absorbance was read at 540 nm using an ELX800 UV universal microplate reader. The 100% viability was established with control cultures. Assays were done in duplicate using three independent cell cultures.

## **Results and discussion**

### Chemical and structural characterization of copper(II) complexes

The complexes were synthesized and the results of the elemental analysis, as well as the chemical formula proposed for the complexes Cu(II)Urea<sub>2</sub> and Cu(II)Biuret<sub>2</sub>, are in good agreement with the expected stoichiometry (Table 5.1). The solid complexes are stable in air, easily soluble in water, and insoluble in alcoholic media.

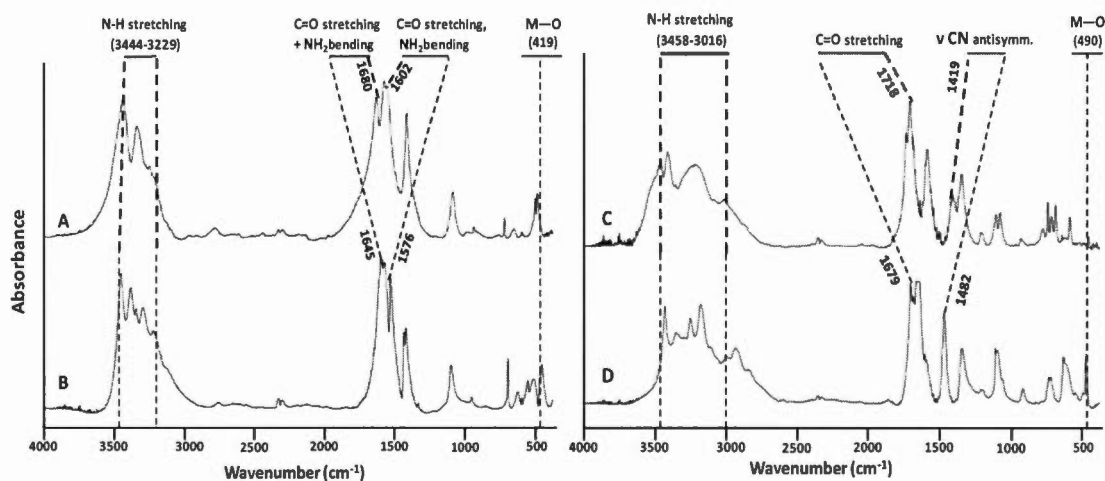


**Tableau 5.1** Physical parameters and composition of Cu(II)Urea<sub>2</sub> and Cu(II)Biuret<sub>2</sub> complexes.

Compounds	Cu(II)Urea <sub>2</sub>		Cu(II)Biuret <sub>2</sub>	
Melting point (°C)	161.6±2.3		171.6±1.1	
Molecular Formula	C <sub>2</sub> H <sub>8</sub> Cl <sub>2</sub> Cu N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>		C <sub>4</sub> H <sub>10</sub> Cl <sub>2</sub> Cu N <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	
Molecular weight (g.mol <sup>-1</sup> )	254.56		340.61	
Elemental analysis (%)	Found	Calculated	Found	Calculated
N	23.61	21.99	25.02	24.67
C	9.33	9.42	14.59	14.11
H	3.23	3.14	2.98	2.94

Figure 5.1 (A,B) illustrates the FTIR spectra obtained in the region of 4000–400 cm<sup>-1</sup> for urea and Cu(II)Urea<sub>2</sub>, and Table A 2.2 summarizes the most important absorption bands and their attribution. The bands between 3444 and 3259 cm<sup>-1</sup> assigned to the NH stretching vibration in the spectrum of urea are observed almost at the same respective frequencies in the Cu(II)Urea<sub>2</sub> spectra. This may indicate that nitrogen is probably not involved in the formation of the Cu(II)Urea<sub>2</sub> complex. However, the intense absorption bands at 1680 and 1602 cm<sup>-1</sup> corresponding to the C=O stretching and to the NH<sub>2</sub> bending vibrations are shifted to lower frequencies (1616 and 1576 cm<sup>-1</sup>) in the spectrum of the complex. This may indicate a possible implication of oxygen from the carbonyl group of urea in the coordination with copper(II) ions (Theophanides et al, 1987). This involvement of oxygen in complexation is also supported by the 419 cm<sup>-1</sup> band corresponding to M–O vibration (Pop et al, 2002; Gangopadhyay et al,2016) in Cu(II)Urea<sub>2</sub> spectra.

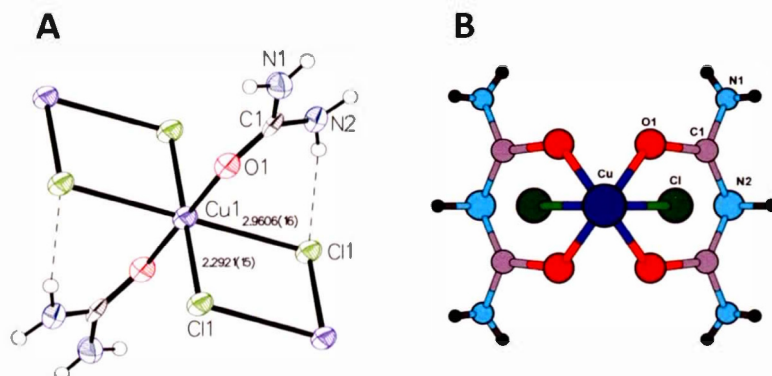
The FTIR spectra of biuret and of Cu(II)Biuret<sub>2</sub> complex are shown in figure 5.1 (C,D), and the main infrared spectral data are listed in Table A 2.3. The five bands attributed to the NH stretching vibration observed in the Cu(II)Biuret<sub>2</sub> spectrum are similar to the bands in the range of 3458-3016 cm<sup>-1</sup> observed in the spectrum of biuret ligand.



**Figure 5.1** FTIR spectra of urea (A), of  $\text{Cu(II)Urea}_2$  (B), of biuret (C) and of  $\text{Cu(II)Biuret}_2$  (D) in the wavenumber range of  $4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$

This might indicate that probably not all nitrogens are involved in the formation of the complex. A symmetric vibration frequency of C=O stretching appears near  $1718\text{ cm}^{-1}$  in the biuret spectrum. When coordination occurs, a shift of the C=O stretching mode to lower frequencies is reported (Wang et al, 2016) indicating that coordination could be produced with participation of the oxygen (Gangopadhyay et al, 2016). In fact, a vibration peak in the complex was detected at  $1679\text{ cm}^{-1}$ , which is slightly lower than the biuret frequency. As in the case of  $\text{Cu(II)Urea}_2$  complex, the presence of a  $490\text{ cm}^{-1}$  band ascribed to M–O vibration suggests the participation of oxygen in a coordinative complexation between biuret and copper(II) ion (Wang et al, 2016).

The X-ray structure of  $\text{Cu(II)Urea}_2$  complex (Fig.5.2A), with geometrical sizes of bonds and angles listed in Tables A 2.4.1-A 2.4.4, reveals a chain structure, with the chloride ions acting as bridges. The Cu(II) ions are hexacoordinated by four chlorido bridges and by the oxygen atoms from two urea molecules, showing an elongated octahedral stereochemistry. The apical positions are occupied by two semi-coordinated chlorido bridging ligands ( $\text{Cu1 - Cl1} = 2.9606\text{Å}$ ); the equatorial plane is made by two urea ligands and by two chlorido bridges ( $\text{Cu1 - Cl1} = 2.2920$ ;  $\text{Cu1 - O1} = 1.955$ ).



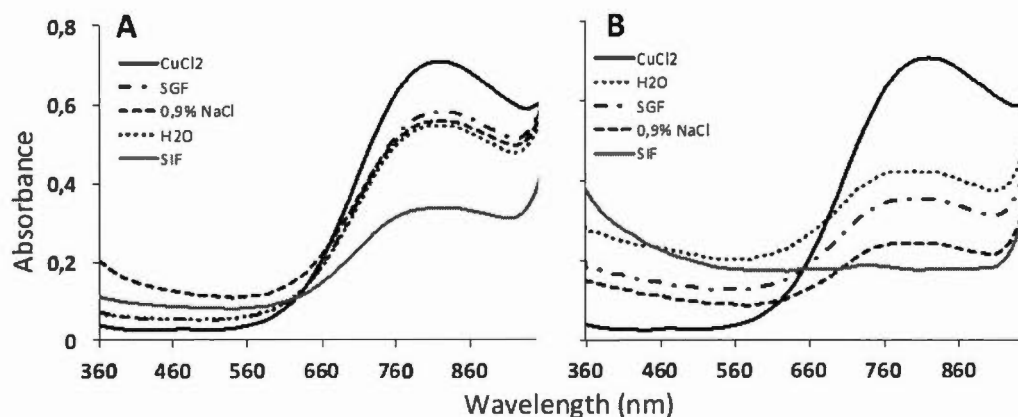
**Figure 5.2** Molecular structure of Cu(II)Urea<sub>2</sub> (A) obtained from crystal X-ray diffraction and molecular structure proposed for Cu(II)Biuret<sub>2</sub> (B) complex.

Although urea has two potential donor atoms in its structure (carbonyl oxygen and amide nitrogen), it is frequently coordinated through the oxygen atom as a monodentate ligand and the C=O–M angle is often smaller than 180° (Theophanides et al, 1984). This is in agreement with our results because the C=O–M angle found in our Cu(II)Urea<sub>2</sub> complex is 133.6°. The Cl<sub>1</sub>–Cu<sub>1</sub>–Cl<sub>1</sub><sup>1</sup>Cu angle and O<sub>1</sub>–Cu<sub>1</sub>–O<sub>1</sub><sup>1</sup> angle are 180° whereas the O<sub>1</sub>–Cu<sub>1</sub>–Cl<sub>1</sub> angle and the O<sub>1</sub><sup>1</sup>–Cu<sub>1</sub>–Cl<sub>1</sub><sup>1</sup> angle are 91.9°.

The proposed structure for Cu(II)Biuret<sub>2</sub> (Fig. 5.2 B) is based on our results obtained by FTIR, on the correlation of crystal X-ray diffraction previously described by Freeman et al (1966) and on diffractogrammes obtained with our preparation (data not shown). In Cu(II)Biuret<sub>2</sub> complex, the copper atom has coordination number 6 and a tetragonally distorted octahedral environment. The binding to the four oxygen atoms of ligands is covalent and the Cu–O bond-lengths are consistent with a covalent length while the Cu–Cl distances are consistent with ionic bonding between Cl<sup>–</sup> and Cu<sup>2+</sup> ions (Freeman et al, 1966). The biuret molecules act as bidentate chelates via their oxygen atoms (Freeman et al, 1966).

### Stability studies in different physiological media.

Considering the potential use of these copper complexes as additives, it was of interest to explore their stability in various physiological media. Figure 5.3 shows the absorption spectra of the prepared copper (II) complexes. Cu(II)Urea<sub>2</sub> and Cu(II)Biuret<sub>2</sub> complexes, showed a large absorption band in visible probably due to a d-d transition (Wang et al, 2016). The molar extinction coefficients of this band varied up to 20 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>.



**Figure 5.3** Visible spectra of Cu(II)Urea<sub>2</sub> (A) and of Cu(II)Biuret<sub>2</sub> (B) at 40 mM in H<sub>2</sub>O (pH 7.4), 0.9% NaCl (pH 7.4), SGF (pH 1.5), and SIF (pH 7.4). The spectrum of the aqueous solution of CuCl<sub>2</sub> (20 mM) is included for comparison.

Cu(II)Urea<sub>2</sub> spectra (Fig. 5.3A) were similar in H<sub>2</sub>O, 0.9% NaCl and SGF (pH 1.2) with maximal of absorption at 810 nm while in SIF (pH 7.4) the maximal absorption was at 830 nm with a remarkable decrease of signals ( $\approx 50\%$ ). The change in the spectrum was probably due to the presence of phosphate ions which can form a precipitate in water by the displacement of the two chloride anions generating the copper(II) urea phosphate complex (Naumov et al, 2001). Similarly, the spectra of Cu(II)Biuret<sub>2</sub> (Fig. 5.3B) in H<sub>2</sub>O, 0.9% NaCl and SGF (pH 1.2) exhibited maximal absorption at 810 nm but the intensity of the signal was different in each medium. In SIF the formation of a green precipitate was observed when Cu(II)Biuret<sub>2</sub> was added.

### *In vitro* antioxidant capacity

Given the complexity of oxidation processes and the diversified nature of the antioxidants, with both hydrophilic and hydrophobic reagents, there is not a unique well-defined method for quantitative measurement of antioxidant activity. In most cases it is necessary to combine the responses of different and complementary tests in order to obtain an indication of the antioxidant capacity of a sample (Huang et al, 2005).

Practically, according to the reactions involved in the scavenging processes, the antioxidant capacity assays can be divided into two categories: (i) hydrogen atom transfer (HAT) assays of the ability of a potential antioxidant to scavenge free radicals by hydrogen donations (Huang et al, 2005) and (ii) single electron transfer (SET) assays of the ability of a potential antioxidant to transfer one electron to reduce any compound (Huang et al, 2005). In the present study, the antioxidant activities of urea and of biuret agents and of their copper(II) complexes were evaluated using the two types of assays: the DPPH assay for the HAT mechanism and the DEPDA assay for the SET mechanism. Urea antioxidant activity was reported in earlier studies using N,N'-diethyl-p-phenylenediamine assay (Wang et al, 1999).

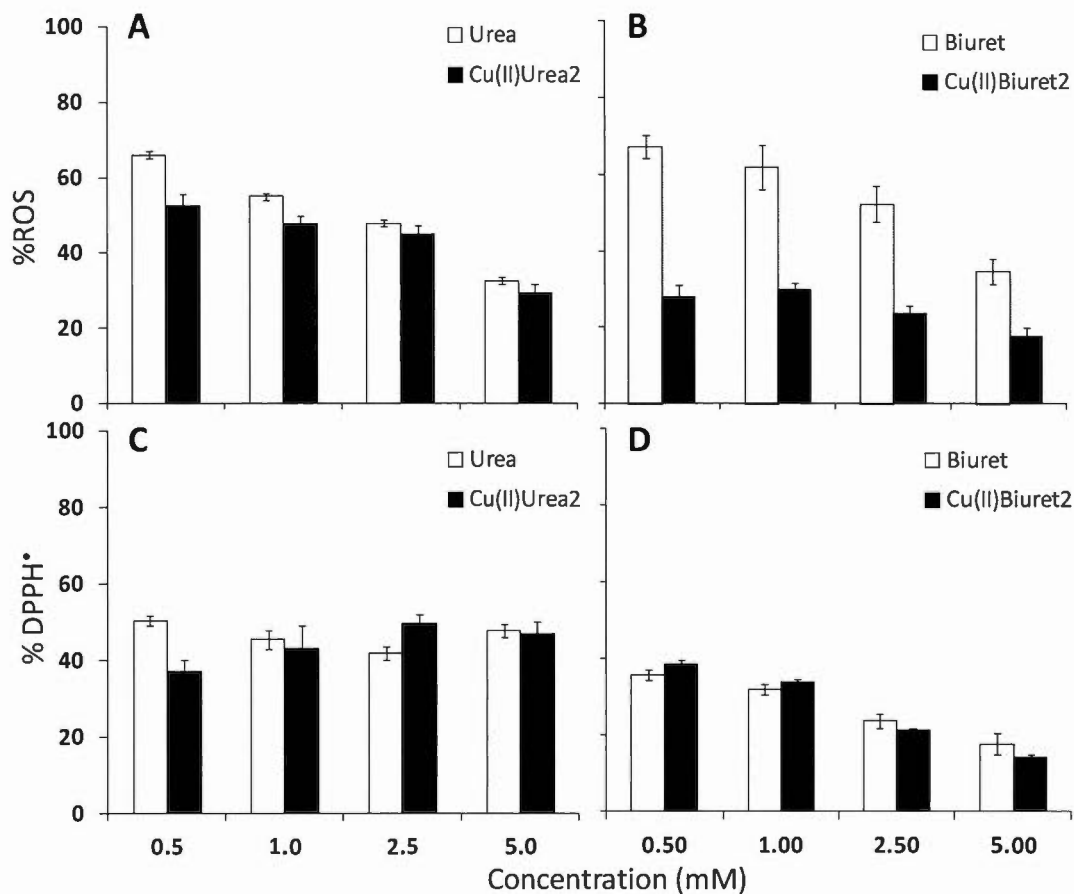
The electrolysis of KH (10 mA, 400 mV, 3 min) may generate ROS such as superoxide anion ( $\bullet\text{O}_2^-$ ), singlet oxygen ( $^1\text{O}_2$ ) and hydroxyl radical ( $\bullet\text{OH}$ ) and their by-products: hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) and hypochlorite ion ( $\text{OCl}^-$ ) (Jackson et al, 1986). In the presence of urea, of  $\text{Cu(II)Urea}_2$ , of biuret or of  $\text{Cu(II)Biuret}_2$ , part of ROS could be scavenged and the remaining concentration of ROS in ELS KH can be measured by the DEPDA assay (Fig. 5.4 A,B).

All four compounds (in the concentration range of 0.5-5 mM) have shown a capacity to scavenge ROS but the  $\text{Cu(II)Biuret}_2$  complex had the highest antioxidant activity. For all four compounds, the inhibition of ROS generation varied in a moderate

concentration-dependent manner. Noteworthy, in contrast to urea and Cu(II)Urea<sub>2</sub> having similar antioxidant activity, Cu(II)Biuret<sub>2</sub> had twice as much higher antioxidant activity than its biuret ligand. This may be due to the presence of more amide groups in the biuret ligand which are not involved in the complex coordination or to a better configuration allowing a more favourable involvement of Cu<sup>2+</sup> in the scavenging process.

The antioxidant potential of urea, biuret and their copper(II) complexes was also evidenced by the DPPH assay. The free radical DPPH• test is recommended for compounds containing -SH, -NH and -OH groups (Caillet et al, 2011; Popovici et al, 2009). The results presented in figure 5.4 (C,D) shown that the four compounds can scavenge DPPH•. The biuret and Cu(II)Biuret<sub>2</sub> complex seem to have a slightly higher antioxidant capacity and this activity appears to be concentration-dependent.

In contrast, the antioxidant capacities of urea and Cu(II)Urea<sub>2</sub> appear unrelated to the concentration. The DPPH radical scavenging apparently occurs in two steps: (i) a fast step essentially consisting of the abstraction of the most labile H-atoms from the antioxidant, and (ii) a slow step reflecting a remaining activity on the oxidation/degradation products derived from the first step (Mishra et al, 2012; Zou et al, 2016). In this context, it is possible that both urea and Cu(II)Urea<sub>2</sub> complex would have the ability to scavenge DPPH radical by hydrogen donations (from the -NH group) accomplishing the fast step (Zou et al, 2016), whereas during the slow step which is closely related to the incubation time each antioxidant might react with different kinetics (Mishra et al, 2012).



**Figure 5.4** The percentages of remaining ROS after electrolysis (10 mA, 400 V, 1 min) of KH solutions determined by the DEPDA assay (A, B) or of remaining DPPH• radical (C,D) after scavenging reaction with urea or Cu(II)Urea<sub>2</sub> (A,C) or with biuret or Cu(II)Biuret<sub>2</sub> (B,D). Values are presented as means  $\pm$  SEM (n = 3)

Practically, all four studied compounds exhibited antioxidant capacity when evaluated by both HAT and SET mechanisms but Cu(II)Biuret<sub>2</sub> complex presents higher antioxidant activity in comparison to its urea counterpart. This may be due to the presence of more amide groups in the biuret ligand which are not involved in the complex coordination or to a better configuration, favourable to the scavenging process.

### Biocompatibility of urea, biuret and of their copper (II) complexes.

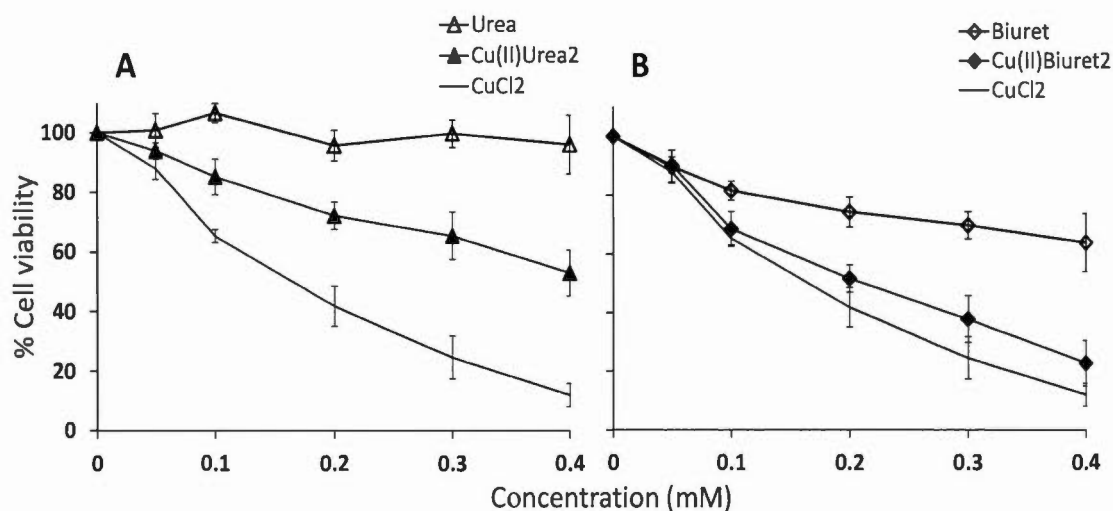
The biocompatibility of the compounds was assessed by the Neutral Red (NR) viability assay done on P19 neuron cultures. This assay was recommended (Gomez et al, 2017) for viability assays cells exposed to copper compounds used in physiologically relevant copper concentrations (Fig. 5.5). For instance, copper concentration is about 0.07 mM in the normal brain parenchyma and can reach 1.3 mM in subjects affected by the Wilson disease (Deschamps et al, 2005). Urea did not affect viability at least in concentrations up to 0.4 mM (Fig. 5.5 A). Differently, biuret slightly decreased viability in a concentration dependent manner (Fig. 5.5 B). The toxicity of biuret may be due to its transformation in products different from urea or to its stronger action as a chaotropic agent. It has been reported that biuret can inhibit, directly or indirectly, protein synthesis in plants. (Webster et al, 1957). However, the metabolic action of biuret in neuronal cells is still unknown.

Compared to urea and biuret themselves, complexation with copper(II) either induced  $[\text{Cu(II)Urea}_2]$  or accentuated  $[\text{Cu(II)Biuret}_2]$  cell viability loss in a concentration dependent manner (Fig. 5.5). Therefore, although biuret,  $\text{Cu(II)Urea}_2$  and  $\text{Cu(II)Biuret}_2$  exhibited remarkable *in vitro* antioxidant activity by DEPDA and DPPH assays, they altered neuronal viability. These results suggest that in biological systems additional phenomena could occur. For example, the bidental and monodental copper complexes could release copper ions in the culture medium, which could generate ROS, promoting apoptosis and damaging DNA (Jemberk et al, 2014; Halliwell et al, 2015). Nevertheless, the cytotoxicity of the synthesized copper (II) complexes was still lower compared to equivalent concentrations of  $\text{CuCl}_2$ .

In contrast to what we observed with biuret and with copper complexes, urea exhibit not only a good cell biocompatibility but also pronounced *in vitro* scavenging effect against ROS. Worth to mention is that urea presents a good biocompatibility in relatively large range of concentrations (Fig. 5.5A) up to 5 mM (Fig. A 2.1) which is a



concentration level encountered in normal adult human brain (2,3- 6,5 mM) (Decaux et al, 2001).



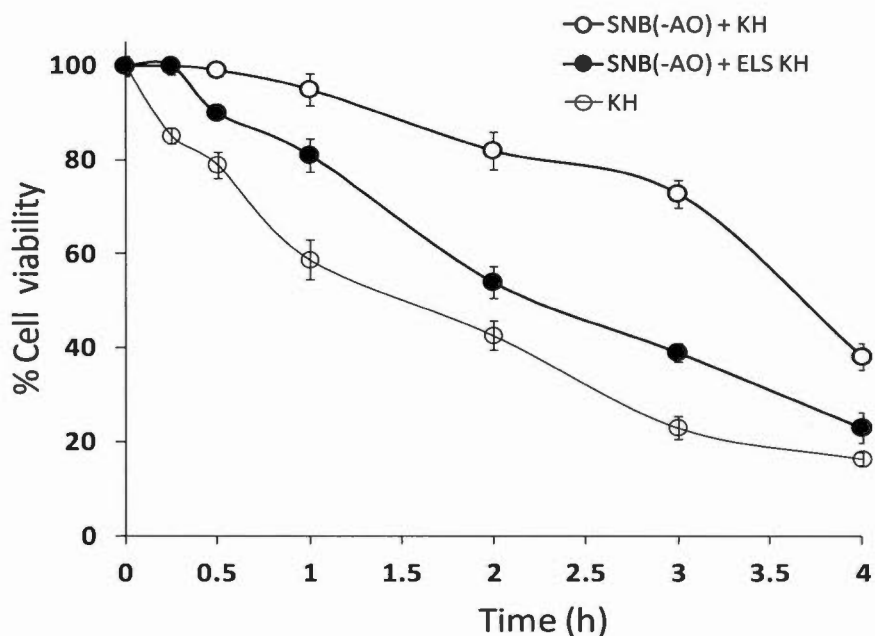
**Figure 5.5** Cell viability in the presence of urea or of Cu(II)Urea<sub>2</sub> (A), or of biuret or Cu(II)Biuret<sub>2</sub> (B). The viability of cells treated with CuCl<sub>2</sub> is included for comparison. Values are presented as means  $\pm$  SEM (n = 3).

#### Effect of urea on the survival of P19 neurons submitted to oxidative stress

Urea was previously shown to exhibit cardioprotective properties in ischemia-reperfusion conditions (Wang et al, 1999). It was of interest to investigate a possible protective role of urea on the survival of P19 neurons submitted to oxidative stress. Neurons are particularly sensitive to oxidative stress due to their reliance on oxidative metabolism as an important source of energy. In this series of experiments, neurons were cultured in the presence of SNB medium depleted in antioxidants (SNB(- AO)) in order to isolate urea action. The source of ROS was KH ELS buffer.

We first determined a suitable way to introduce KH and KH ELS buffers in the culture medium. Completely replacing SNB(-AO) by KH buffer was highly detrimental to

cells, leading to massive cell detachment (data not shown) and hence important loss of viable cells (Fig. 5.6).

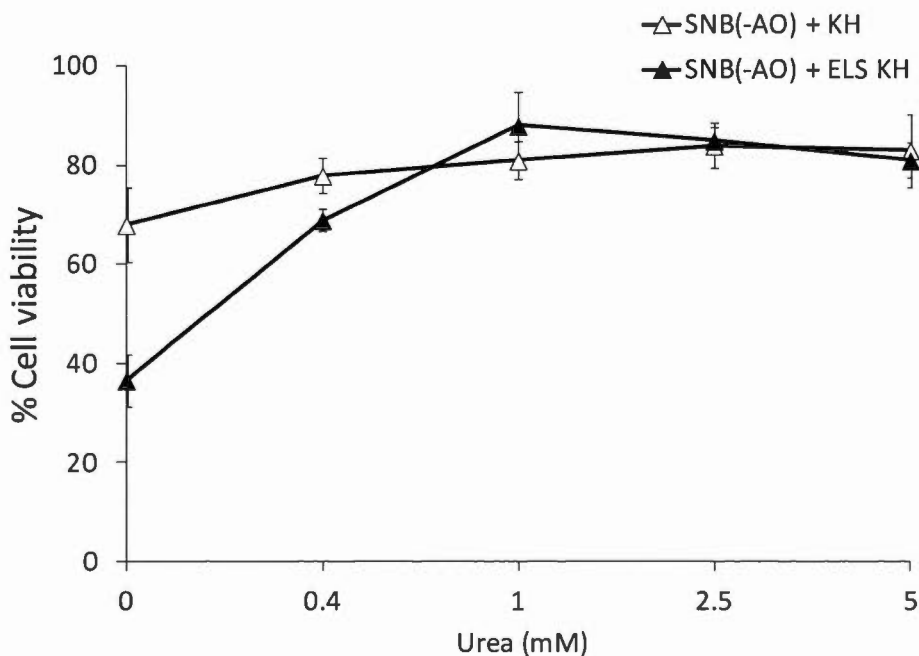


**Figure 5.6** Time-dependent effects of KH or of KH ELS on cell viability whether or not SNB(-AO) was present in the culture medium. Values are presented as means  $\pm$  SEM ( $n = 3$ ).

However, if only half of SNB(-AO) medium was replaced by KH, the loss in cell viability followed a much milder slope, and half replacement with KH ELS still resulted in gradual instead of abrupt loss of cell viability. The half-replacement protocol was therefore adopted. We also selected 3h as the duration of the exposure of cells to electrolyzed buffer since the low viability observed at 3h (40%) would permit to see any protective effect against mortality.

Figure 5.7 shows the beneficial impact of urea on the viability of P19 neurons exposed to KH ELS buffer. Cell viability was stable (70-75%) in the presence of KH buffer for all urea concentrations (including no urea). However, in the presence of KH ELS buffer, cell viability was about 35% in the absence of urea but completely recovered

the level seen in non-electrolysis conditions in the presence of 1 mM urea. The neuroprotective role of urea is likely due to its scavenging capacity against ROS. However, more research is needed to assess the real role of urea in biological systems.



**Figure 5.7** Effect of different concentrations of urea in cell viability under oxidative stress conditions induced by KH ELS. Values are presented as means  $\pm$  SEM (n = 3).

In conclusion, the results showed that although biuret,  $\text{Cu(II)Biuret}_2$  and  $\text{Cu(II)Urea}_2$  present an antioxidant activity *in vitro* when tested with DEPDA and DPPH assays, they affect neuronal viability *in vivo*. In fact,  $\text{Cu(II)Biuret}_2$  was the best in the antioxidant assays but the worst in biocompatibility. However, the cytotoxicity of this complex was still lower than that of  $\text{CuCl}_2$ . In contrast to these compounds, urea is biocompatible even though its *in vitro* antioxidant activity is not the highest one. In fact, neurons can grow in a medium enriched in urea which can protect them against damage caused by excess of ROS.

**Acknowledgements**

Financial support from NSERC (Natural Science and Engineering Research Council) of Canada (Discovery grant 06945 to MAM and Discovery grant 105730 to JP) and from Foundation Courtois (Canada) is gratefully acknowledged. MGP holded a studentship from the FARE of Université du Québec à Montréal. We thank Clara Lafortune-Sgambato and Lyvia Fourcade for help in cell culture experiments.

## CHAPITRE VI

### LE TEST ROUGE NEUTRE VERSUS MTT POUR LE DOSAGE DE LA VIABILITÉ CELLULAIRE EN PRÉSENCE DE COMPOSÉS CUIVRIQUES

#### **Contribution de l'auteur principal et des co-auteurs**

##### **Auteure principale:**

**Mariela Gomez Perez:** Contribution à la élaboration des concepts, à la préparation de protocoles, à la réalisation des expériences, aux traitement des résultats, à la recherche bibliographique et à la rédaction.

##### **Co-auteurs**

**Joanne Paquin :** Participation à la rédaction et à la correction des manuscrits, élaboration du concept, supervision des expériences ainsi que l'analyse et le traitement de résultats.

**Mircea Alexandru Mateescu :** Direction du projet, participation à la rédaction et à la correction des manuscrits, coordination des travaux et élaboration du concept.

**Lyvia Fourcade :** Contribution à la réalisation des expériences (Tests de viabilité LDH (lactate déshydrogénase) et MTT avec composé à cuivre)

## 6.1 Le test rouge neutre versus MTT pour le dosage de la viabilité cellulaire en présence de composés cuivriques

Mariela Gomez Perez, Lyvia Fourcade, Mircea Alexandru Mateescu, Joanne Paquin<sup>a</sup>  
Département de chimie et Centre de recherche BioMed, UQAM.

Le cuivre est essentiel pour de nombreuses fonctions physiologiques et les composés de cuivre peuvent présenter des effets thérapeutiques et cytotoxiques. Le dosage du MTT (bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényle tetrazolium) est un test standard largement utilisé dans les études de cytotoxicité. Ce rapport montre que aux niveaux micromolaires de composés de cuivre tels que  $\text{Cu(II)Urée}_2$ ,  $\text{Cu(II)Ser}_2$  et  $\text{CuCl}_2$  peuvent interférer avec le test MTT rendant inappropriée la détection du produit formazan provenant de la réduction du MTT. Le dosage alternatif de la lactate déshydrogénase ne peut pas être utilisé en raison de l'effet inhibiteur de ces composés de cuivriques sur l'activité enzymatique. Comparativement, au MTT, le test Rouge Neutre semble être sensible et ne présente aucune interférence avec ces composés.

---

\*corresponding author: Joanne Paquin

## Neutral Red versus MTT assay of cell viability in the presence of copper compounds

Mariela Gomez Perez, Lyvia Fourcade, Mircea Alexandru Mateescu and Joanne Paquin<sup>a</sup>

Department of chemistry and Center Biomed, UQAM

### Abstract

Copper is essential for numerous physiological functions, and copper compounds may display therapeutic as well as cytotoxic effects. The MTT (3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) assay is a standard test largely used in cytotoxicity studies. This report shows that low micromolar levels of copper compounds such as Cu(II)Urea<sub>2</sub>, Cu(II)Ser<sub>2</sub> and CuCl<sub>2</sub> can interfere with the MTT assay making improper the detection of formazan product of MTT reduction. Comparatively, the Neutral Red assay appears to be sensitive and showing no interference with these compounds. The lactate dehydrogenase alternative assay cannot be used because of inhibitory effect of these copper compounds on the enzyme activity.

**Keywords:** Amino acid copper complexes, urea copper complex, copper salts, MTT assay, Neutral Red assay, neuron viability.

**Abbreviations:** DMSO, dimethyl sulfoxide; HBS/G, HEPES buffer saline supplemented with D-glucose; MTT, 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide; NR, Neutral Red; PBS, phosphate buffer saline; SNB, supplemented Neurobasal

### Highlights

- Copper compounds ( $\geq 10 \mu\text{M}$ ) interfere in MTT but not in Neutral Red assay of cell viability
- The interference seems related to a copper (II) interaction with formazan
- The Neutral Red assay is more sensitive than the MTT assay with P19 neurons

---

<sup>a</sup>corresponding author: Joanne Paquin

## Introduction

Copper is an essential trace element that is involved in several biological processes in all living organisms (Deschamps et al, 2005; Crisponi et al, 2010). When its homeostasis is disturbed it can become toxic through the generation of reactive oxygen species (Crisponi et al, 2010). Physiologically, copper exists mainly bound to metalloproteins, such as ceruloplasmin and aminoxidase, as well as low molecular weight complexes, such as copper(II)-bis-L-histidine (Cu(II)His<sub>2</sub>) (Deschamps et al, 2005). Notably, the latter is used to treat neurological disorders in Menkes disease patients (Deschamps et al, 2005), and other copper complexes such as Cu(II)Ser<sub>2</sub> and Cu(II)Urea<sub>2</sub> were found to exert an antioxidant activity presenting thus a therapeutic potential (Pop et al, 2005). However, the cytotoxicity of copper compounds must be evaluated to assess their suitability in pharmaceutical applications, and cell viability assays provide useful tools for this purpose.

Tetrazolium-based tests such as the MTT<sup>b</sup> assay measure cell viability in terms of the capacity metabolically of active cells to reduce the yellow tetrazolium salt into purple formazan crystals that can be solubilized and quantified spectrophotometrically (Mosman et al, 1983; Lü et al, 2012). However, tetrazolium-based assays could be influenced by a variety of chemicals exhibiting redox capacity such as phytoestrogens (Brugisser et al, 2002), polyphenols (Wang et al, 2006), vitamins (Chakrabarti et al, 2001), and some metallic compounds and alloys (Wang et al, 2011; fischer et al, 2010). The neutral red (NR) assay measures cell viability in terms of the capacity of live cells to accumulate the dye in lysosomes via non-ionic passive diffusion. The dye is then extracted from cells and quantified by spectrophotometry (Repetto et al, 2008).

This report describes the interference of different copper compounds in MTT assay through their interaction with formazan. It also shows that NR assay is a better choice for evaluating possible effects of copper compounds on cell viability since it is devoid



of interference effects from these compounds and, moreover, is more sensitive. This work has been carried out with cultures of neurons derived from mouse P19 embryonic stem cells (Ducharme et al, 2010). These functional neurons resemble those of the central nervous system.

## **Materials and methods**

### Synthesis of copper complexes

The Cu(II)Urea<sub>2</sub> complex was prepared using an 1:4 molar ratio of CuCl<sub>2</sub>:urea and a 50:1 volume ratio of isopropanol:H<sub>2</sub>O (Pop et al, 2005). A cold isopropanol solution of copper (II) chloride was added dropwise, on ice, to an aqueous urea solution. The mixture was stirred on ice during 30 min. The resulting solid was filtered, washed with isopropanol and dried. This method was modified for the preparation of Cu(II)His<sub>2</sub> and Cu(II)Ser<sub>2</sub> complexes. Cu(II)His<sub>2</sub> was obtained using a CuCl<sub>2</sub>:L-Histidine (His) molar ratio of 1:2. Cu(II)Ser<sub>2</sub> was prepared by adding an ethanol solution of CuCl<sub>2</sub> to an ethanol solution of L-Serine (Ser) and sodium hydroxide (CuCl<sub>2</sub>:Ser:NaOH molar ratio of 1:2:1).

### Cell culture and viability

Mouse P19 embryonic stem cells were differentiated to neurons by exposure to retinoic acid during 4 days [12]. At day 4, neurons were seeded at different cell densities in gelatinized 12 well-plates containing supplemented Neurobasal (SNB) medium [Neurobasal containing 2% v/v B27 supplement (Fisher Scientific, St-Laurent, QC, Canada), 0.5 mM L-glutamine, 50 U/mL penicillin and 50 U/mL streptomycin]. Cell viability was measured spectrophotometrically at day 6 by MTT and NR assays (each done in duplicate in three separate experiments), using an ELX800 UV universal microplate reader (Bio-Tek Instruments Inc., Vermont, USA).

### *MTT assay*

MTT (Sigma–Aldrich, Oakville, ON, Canada) was dissolved at a final concentration of  $5 \text{ mg.mL}^{-1}$  in HEPES buffer saline supplemented with D-glucose (HBS/G: 20 mM HEPES, pH 7.4, 140 mM NaCl, 4 mM KCl, 1.8 mM  $\text{CaCl}_2$ , 0.8 mM  $\text{MgCl}_2$  and 20 mM D-glucose). Each culture well was delicately washed once with phosphate buffered saline solution [PBS: NaCl 0.8%, KCl 0.02%,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.02%,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.12%, pH 7.3] before adding one mL of MTT solution. After 3h incubation ( $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ ), the formed formazan crystals were dissolved in 1 mL of dimethyl sulfoxide (DMSO) and absorbances read at test 550 nm and reference 664 nm wavelengths (Nikkhah et al, 1992).

### *NR assay*

The NR assay was as described (Fotakis et al, 2006; Lim et al, 2015) with modifications. One mL of freshly prepared NR solution ( $138 \mu\text{M}$  in HBS/G) was added to each culture well delicately pre-washed with PBS. Following 2h incubation ( $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ ), NR solution was removed and cultures washed rapidly with 1% formaldehyde-1% calcium chloride. One mL of NR eluent (EtOH:H<sub>2</sub>O:acetic acid 50:49:1) was added to extract NR from cells. After 10 min agitation at room temperature, the absorbance was read at 540 nm.

### Spectrophotometric profiles of formazan, MTT and NR

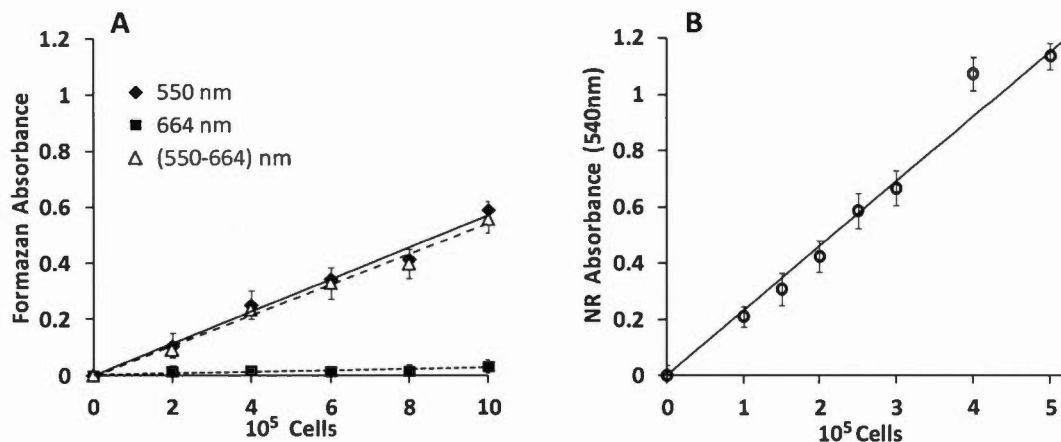
Solutions of reduced MTT (formazan) in DMSO were obtained by incubating cell cultures with MTT. MTT (unreduced) was dissolved in HBS/G ( $5 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) and NR in its eluent solvent ( $138 \mu\text{M}$ ). The copper compounds (stock solutions of 2 mM in water) were added to concentrations of 1 to 200  $\mu\text{M}$ , and absorbances recorded from 360 to 800 nm with a Varian Cary 1E spectrophotometer. The copper compounds in MTT solutions were incubated 3h before recordings.

## Results and discussion

The MTT and NR assays are commonly used to evaluate effects of different compounds on cell viability. In the absence of copper complexes, both assays gave linear relationships between absorbance and the number of seeded neurons (Fig. 6.1). It is worth noting that equivalent curves were obtained whether the MTT signals at 550 nm were reported with or without correction by corresponding readings at 664 nm (Fig. 6.1 A). Indeed, readings were at baseline level at this reference wavelength.

However, compared to untreated cultures, cultures treated with copper compounds and analysed by the MTT assay exhibited increases of up to 0.2 unit absorbance at 664 nm. Three hypotheses were considered to explain the origin of such high absorbance at the reference wavelength: (i) residual copper compounds left in the culture wells after washing may absorb in this spectral region, or (ii) they may interact with formazan, or (iii) they may interact with MTT. The first hypothesis was ruled out on the basis of absorbance profiles of copper compounds in aqueous solutions. These compounds absorbed maximally in the 600-800 nm region but with low apparent molecular extinction coefficients of  $20 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ , which would generate readings of about 0.004 for 200  $\mu\text{M}$  of copper agents (not shown). The second hypothesis was favoured from analysis of formazan and MTT absorbance profiles obtained in absence and presence of copper compounds (Fig. 6.2 A-D)

Formazan absorbed in the region between 420 and 664 nm, with maximum absorbance at 500 nm and a shoulder at 550 nm (Fig. 6.2 A,B). Addition of 200  $\mu\text{M}$  of  $\text{Cu(II)Ser}_2$ ,  $\text{Cu(II)Urea}_2$  or  $\text{CuCl}_2$  greatly displaced formazan signals from 500 and 550 nm to a broad band at 650-700 nm (Fig. 6.2 A).

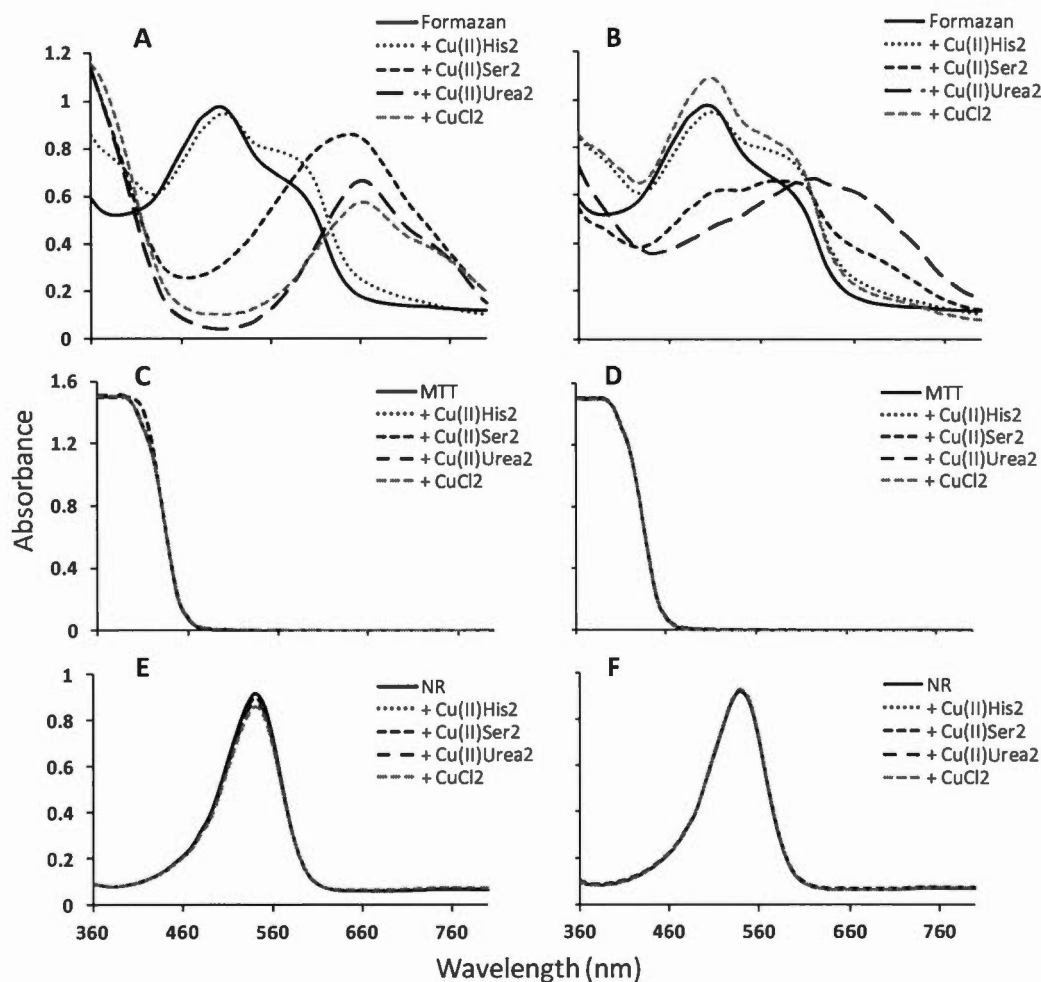


**Figure 6.1** Effect of the number of seeded cells on formazan (A) and NR (B) signals. Seeding was done at day 4 of neuronal differentiation and absorbances measured 48h later. Values are expressed as means  $\pm$  SEM of three independent cell series. Half error bars are shown in A for the 550 nm and 550-664 nm values for sake of clarity.

This displacement, still visible at 10, 50 and 100  $\mu$ M (Fig. A 3.1), would result in underestimated cell viability. Changes in formazan absorbance upon addition of copper compounds was accompanied by changes in the colour of formazan solution from purple to greenish blue (Fig. A 3.2); this is another observation in accordance with an eventual interaction between formazan and copper compounds. Interestingly, Cu(II)His<sub>2</sub> did not greatly modify formazan absorbance profile and color, which could be due to a higher stability of this copper compound. According to Deschamps et al, (2005), the tridentate ligation in the Cu(II)His<sub>2</sub> complex confers greater stability compared to bidentate ligations such as found in Cu(II)Ser<sub>2</sub> and Cu(II)Urea<sub>2</sub>. Since a redox reaction with formazan is unlikely, a kind of complexation is thus proposed. A possible interaction of copper complexes with MTT itself was not excluded but figure 6.2 C and 2D clearly show that these complexes if they exist did not affect the spectrum of MTT in the 360-800 nm interval.

Could the interference induced by the complexation of copper compounds and formazan in the MTT assay be overcome? Washing cell cultures several times before doing the MTT assay could remove any interfering residual copper compounds but cultures that do not adhere firmly to the support may not resist extensive washings. This is the case for P19 neurons which are cultured in the absence of serum to prevent fibroblast growth. The possible internalization of copper compounds is also of concern (Seth et al, 2004). Since internalized compounds are not removable by washes, they could interfere in the MTT assay.

The eventual interference of copper (II) compounds in the measure of cell viability by the NR assay was evaluated. The NR dye had a unique major band below 460 nm (Fig. 6.2 E,F). At concentrations of 10 to 200  $\mu\text{M}$ , copper compounds had no influence on this band (position and intensity) and moreover did not induce any band at higher wavelengths including at 540 nm used in the assay. Interaction between these compounds and NR is thus unlikely. Noteworthy, the NR assay was more sensitive than the MTT assay, requiring fewer cells for analysis. In absence of copper (II) compounds, the absorbance for 0.5 million cells was about 1.0 for the NR assay compared to 0.30 for the MTT assay (Fig. 6.1). We also tested whether the LDH assay could be used to assess cell viability in the presence of copper (II) compounds. Using a MAK066 kit from Sigma-Aldrich with P19 neuron extracts, we found that 250  $\mu\text{M}$  of  $\text{Cu(II)Ser}_2$  or  $\text{CuCl}_2$ , but not  $\text{Cu(II)His}_2$ , caused a 50% decrease in enzyme activity (not shown), indicating the unsuitability of the LDH assay with some copper compounds.



**Figure 6.2** Spectrophotometric profiles of formazan (A,B), MTT (C,D) and NR (E,F) in the absence and presence of 200  $\mu\text{M}$  (A,C,E) and 10  $\mu\text{M}$  (B,D,F) copper compounds *in vitro*.

In conclusion, our results show the necessity to carefully select the viability assay when evaluating the cytotoxicity of copper compounds. Indeed, some of these compounds may interact with the formazan product of MTT reduction. It should be noted that this interference is not an issue under normal cell incubation conditions (that is in absence of added copper compounds) since the levels of copper would be too low for such an effect. Contrary to the MTT assay, the sensitive NR assay seems devoid of interference effects by copper compounds.

**Acknowledgements**

This work was supported by the National Sciences and Engineering Research Council of Canada (grant number 105730 to JP and 371230 to MAM) and by the Courtois Foundation, Canada. MGP held a studentship from the Fondation of the Université du Québec à Montréal. The authors declare no conflict of interest.

## CHAPITRE VII

### DISCUSSION GÉNÉRALE

L'excès des EROs peut causer des dommages au niveau des composants cellulaires vitaux, tels que les lipides, les protéines et l'ADN qui conduisent à la mort cellulaire par stress oxydatif. Ainsi, l'augmentation du stress oxydatif se traduit en l'élévation du risque de l'incidence de différentes pathologies létales comme les cancers, les maladies cardiovasculaires et les maladies neurodégénératives (Carocho et al, 2013).

Différentes molécules considérées comme étant des puissants agents antioxydants ont montré des contraintes lors qu'elles agissent dans des systèmes biologiques (Flora, 2009). La capacité antioxydante d'une molécule peut être limitée par une mobilité réduite ou une distribution compartimentée dans l'organisme (i.e SOD et CAT) ou bien par leur caractère hydrophobique (ex. vitamine E). En même temps, d'autres antioxydants, comme la vitamine C, peuvent aussi présenter une activité pro-oxydante générant des radicaux libres, ce qui induit des effets cytotoxiques aux concentrations élevées (Carocho et al, 2013). C'est pourquoi un nombre considérable de recherches continuent à être consacrées à trouver nouveaux agents antioxydants.

Dans ce contexte, l'urée comme antioxydant et agent cardioprotecteur (Wang et al, 1999), semble présenter plusieurs avantages par rapport aux autres antioxydants naturels ou synthétiques, notamment, en raison de son faible poids moléculaire et de la mobilité qui présente dans les systèmes biologiques.



Certains dérivés de l'urée, comme la thiourée et l'hydroxyurée, ont été considérés comme de puissants antioxydants (Wang et al, 1999). Cependant, des effets cytotoxiques ont été montrés pour ces deux dérivés. Le biuret est aussi un dérivé de l'urée qui peut être considéré comme un agent antioxydant potentiel.

Des protéines à cuivre comme la CP et la DAO ont été signalées comme antioxydants (Dumoulin et al, 1996; Mateescu et al, 1997; Atanasiu et al, 1998) et agent neuromodulateurs (Maltais et al, 2003; Ducharme et al, 2010) dont la fonctionnalité semble être principalement reliée à la présence de cuivre (II) dans sa structure (Bento et al, 2007; Ducharme et al, 2010). Cependant, des applications pour les protéines à cuivre d'origine animale ne sont pas envisageables considérant qu'elles ont une masse moléculaire élevée et des réponses immunitaires, possiblement létales, qu'elles peuvent générer chez l'individu. Pour cela, dans le présent projet, il a été considéré d'inclure l'étude des propriétés antioxydantes et de la biocompatibilité de l'urée, du biuret et de leurs complexes à cuivre (II) ( $\text{Cu(II)Urée}_2$  et  $\text{Cu(II)Biuret}_2$ ).

### **7.1 Caractérisation structurale des complexes à cuivre (II)**

Les complexes à cuivre (II) ont été synthétisés et leurs structures probables ont été vérifiées par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (Fig. 5.1) et diffraction de rayons X (Fig. 5.2). L'étude cristallographique du  $\text{Cu(II)Urée}_2$  (Fig. 5.2A) révèle que les ions Cu (II) sont hexacoordinés par quatre ponts chlore et par les atomes d'oxygène de deux molécules d'urée, montrant une stéréochimie octaédrique allongée. La structure proposée pour  $\text{Cu(II)Biuret}_2$  (Fig. 5.2B) est basée sur la corrélation des résultats obtenus par diffraction de rayons X avec notre préparation et ceux décrits par Freeman et al (1966) qui a signalé que l'atome de cuivre avait un numéro de coordination 6 et que les molécules de biuret comme des chélates bidentés via leurs atomes d'oxygène pourraient agir dans un environnement octaédrique déformé de manière tétragonale (Freeman et al, 1966).

## 7.2 Stabilité des complexes à cuivre (II) dans des milieux physiologiques

Compte tenu de l'utilisation potentielle de ces complexes de cuivre, il était intéressant d'explorer leur stabilité dans divers milieux physiologiques. Il est à signaler que les spectres du Cu(II)Urée<sub>2</sub> et du Cu(II)Biuret<sub>2</sub> dans H<sub>2</sub>O, dans 0,9 % NaCl et dans du SGF (pH 1,2) ne présentaient pas de grands changements d'allure (Fig. 5.3). Cependant, une remarquable diminution du signal ( $\approx 50\%$ ) a été observé dans les spectres des complexes à cuivre (II) dans du SIF (pH 7,4). Dans ce cas, il est possible que les ions phosphates présents dans le SIF déplacent les deux ligands du pont chlore semi-coordinnés des positions apicales en formant un précipité avec le cuivre (II) (Naumov et al, 2001). D'autre part, la ressemblance entre les spectres Cu(II)Urée<sub>2</sub> et du Cu(II)Biuret<sub>2</sub> avec le spectre du CuCl<sub>2</sub> indique une possible instabilité de ces complexes dans les milieux aqueux. Pourtant, des études supplémentaires devraient être réalisées afin de vérifier si la structure des complexes à cuivre (II) est conservée dans divers milieux physiologiques.

## 7.3 Capacité antioxydante *in vitro*

Dû la complexité des processus d'oxydation et la grande variété des réactifs hydrophiles et hydrophobes utilisés pour la mesure quantitative de l'activité antioxydante d'un composé (Caillet et al, 2011), deux différents tests complémentaires (DPPH• et DEPDA) ont été utilisés pour mesurer la capacité d'un antioxydant potentiel de l'urée, du biuret et des leurs complexes. D'ailleurs, le test DEPDA a été déjà utilisé pour déterminer de l'activité antioxydante de l'urée par Wang et al (1999).

Le potentiel antioxydant de l'urée, du biuret et des leurs complexes a été mis en évidence avec le test DPPH•. Ce test est recommandé pour les composés contenant des groupes -SH, -NH et -OH (Popovici et al, 2009; Zou et al, 2016). Les résultats présentés dans la Figure 5.4 (C, D) montrent que le biuret et le Cu(II)Biuret<sub>2</sub> semble avoir une capacité antioxydante légèrement supérieure dépendante de la concentration, tandis

que l'urée et le  $\text{Cu(II)Urée}_2$  apparaissent comme n'ayant aucun rapport avec la concentration.

L'hypothèse qui pourrait expliquer ce comportement est basée en la cinétique de la réaction entre le DPPH• avec les antioxydants (section 2.4) Dans ce cas, il est possible que l'urée et le  $\text{Cu(II)Urée}_2$  aient la capacité de réduire le radical DPPH• par don d'hydrogène (du groupe NH) en accomplissant l'étape rapide (Zou et al, 2016) mais que le temps d'incubation utilisé (30 min) dans l'analyse ne fût pas adéquat à la cinétique de réaction entre l'urée et le  $\text{Cu(II)Urée}_2$  avec les produits d'oxydation / dégradation de l'étape lente (Mishra et al, 2012)

D'autre part, il faut aussi considérer que le DPPH• est un radical stable, non-physiologique qui persiste pendant des heures en solution, tandis que les radicaux actifs dans les organismes vivants ont une durée de vie de l'ordre de millisecondes à secondes (Mishra et al, 2012). Avec une durée de vie aussi courte, la rapidité avec laquelle chaque groupe peut piéger les radicaux présents est importante (Xie et al, 2014). Pour cela, il a été proposé que la réaction initiale sur DPPH• soit la seule période pertinente pour prédire l'activité d'un antioxydant potentiel dans les organismes vivants (Papariello et al, 1966; Xie et al, 2014). Dans le cas de l'urée et du  $\text{Cu(II)Urée}_2$ , une rapide décoloration de la solution du DPPH•, stable pendant le temps d'incubation a été observé.

Le potentiel antioxydant de l'urée, du biuret et des complexes cuivriques a été aussi évalué par le test DEPDA. En présence d'urée, de  $\text{Cu(II)Urée}_2$ , de biuret ou de  $\text{Cu(II)Biuret}_2$ , une partie d'EROs produites par électrolyse pourrait être piégée, la concentration restante de ces espèces radicalaires dans KH ELS étant mesurée par le dosage DEPDA (Fig. 5.4 A,B). Les quatre composés en étude ont montré une capacité à piéger les EROs de manière modérée et dépendante de la concentration. Cependant, le complexe  $\text{Cu(II)Biuret}_2$  a présenté une activité antioxydante supérieure par rapport aux autres composés. Une activité antioxydante supérieure du biuret et du  $\text{Cu(II)Biuret}_2$

par rapport à ceux d'urée et du Cu(II)Urée<sub>2</sub> pourrait être due à la présence de plus de groupes amides dans le ligand biuret qui ne sont pas impliqués dans la coordination du complexe ou à une meilleure configuration favorable au processus de piégeage. L'importance de ces résultats vient du fait que les EROs produits dans ce test sont générés aussi dans les organismes vivants. Alors, les résultats obtenus permettent prédire que les quatre composés en étude pourraient avoir une activité antioxydante dans les organismes vivants.

#### **7.4 Le test rouge neutre versus MTT pour le dosage de la viabilité cellulaire en présence de composés cuivriques**

Les conditions utilisées dans les tests pour des antioxydants *in vitro* ne sont pas comparables à celles retrouvées *in vivo*. Pour cela d'autres essais sont nécessaires avant d'arriver aux conclusions sur l'action bénéfique des antioxydantes sur les systèmes biologiques. En outre, l'évaluation des possibles effets toxiques des complexes était impérative à cause de la présence dans leurs structures du cuivre qui peut devenir toxique pour les organismes vivants lorsque son homéostasie est perturbée. L'évaluation de la biocompatibilité d'une large liste des composés peut être réalisée en utilisant des essais de viabilité cellulaire. Cependant, il est nécessaire sélectionner soigneusement les tests de viabilité adéquate aux besoins de la recherche et en tenant compte les interférences qui ont été rapportées.

Les tests MTT et le RN sont couramment utilisés pour évaluer les effets de différents composés sur la viabilité des cellules neuronales P19. En absence de complexes à cuivre (II), les deux essais ont donné des relations linéaires entre l'absorbance et le nombre de neuronesensemencés (Fig. 6.1). Néanmoins, les cultures traitées avec des composés à cuivre et analysées par le dosage MTT ont montré des augmentations d'absorbance à la longueur d'onde de référence (664 nm). L'analyse des spectres d'absorbance du formazan et MTT obtenus en absence et en présence de composés de cuivre (Fig. 6.2 A-D) a favorisé l'hypothèse selon laquelle une absorbance élevée à la

longueur d'onde de référence était causée par l'interaction des composées à cuivre (II) avec le formazan. Il convient de noter que cette interférence n'est pas un problème dans des conditions d'incubation cellulaire (en absence de composés de cuivre) puisque les niveaux de cuivre seraient trop bas pour un tel effet.

L'interférence éventuelle des composés du cuivre (II) dans la mesure de la viabilité cellulaire par le test RN a été aussi évaluée. Les spectres d'absorption du RN en présence ou absence des composés de cuivre n'ont pas présenté de changement (position et intensité de la bande absorption). Il est à noter que le test RN était plus sensible que le test MTT, nécessitant moins de cellules pour l'analyse.

### **7.5 Biocompatibilité de l'urée, du biuret et de leurs complexes de cuivre (II)**

Ainsi, la biocompatibilité des composés étudiés sur les cultures de neurones P19 a été évaluée par le test de viabilité RN. Bien que l'urée n'a pas affecté la viabilité cellulaire, le biuret a légèrement diminué la viabilité de manière dépendante de la concentration (Fig. 5.5 A,B). La toxicité du biuret peut être due à sa transformation dans des produits différents à l'urée ou à son action en tant qu'agent chaotrope. Cependant, la voie métabolique de dégradation du biuret dans les cellules neuronales reste encore inconnue.

D'autre part, la complexation du biuret et l'urée avec le cuivre (II) a induit ou accentué la diminution de viabilité cellulaire en mode dépendant de la concentration (Fig. 5). Bien que le biuret, le  $\text{Cu(II)Urée}_2$  et le  $\text{Cu(II)Biuret}_2$  présentent une remarquable activité antioxydante mesurée par les méthodes *in vitro* DPPH et DEPDA, ils ont affecté la viabilité neuronale. Les résultats suggèrent que, dans les systèmes biologiques, des phénomènes supplémentaires pourraient se produire. Par exemple, les complexes de cuivre bidenté  $\text{Cu(II)Biuret}_2$  et monodenté  $\text{Cu(II)Urée}_2$  pourraient libérer des ions de cuivre dans le milieu de culture, ce qui pourrait générer des EROs et favoriser l'apoptose et endommager l'ADN (Jembrek et al, 2014; Halliwell et al, 2015).

Pourtant, la cytotoxicité des complexes à cuivre (II) était plus faible par rapport aux concentrations équivalentes de  $\text{CuCl}_2$ . Le cuivre libre génère des radicaux hydroxyles, très réactifs, à partir du  $\text{H}_2\text{O}_2$ , (réaction Fenton, Fig 2.1); (Carocho et al, 2013). Les radicaux hydroxyles attaquent en oxydant tous les matériaux biologiques. Les dommages de l'ADN sont causés lors de la réaction des radicaux  $\bullet\text{OH}$  avec les nucléotides (Guanine, Adénine, Cytosine et Thymine) (Misiaszek et al, 2012). Les acides gras polyinsaturés qui forment partie de la membrane cellulaire et les lipoprotéines peuvent être également oxydés par le radical hydroxyle en initiant ainsi des chaînes de peroxydation lipidique (Carocho et al, 2013). Les acides aminés, les protéines et les enzymes peuvent aussi être endommagés par l'action du radical  $\bullet\text{OH}$  (Carocho et al, 2013).

#### **7.6 Effet de l'urée sur la survie des neurones P19 soumis au stress oxydatif**

Il est à remarquer que l'urée présente non seulement une bonne biocompatibilité cellulaire, mais aussi un effet *in vitro* de piégeage des EROs. Plus précisément, l'urée présente une bonne biocompatibilité dans une gamme de concentrations relativement large (Fig. 5.5A). L'urée a précédemment été montrée comme ayant des propriétés cardioprotectrices en conditions d'ischémie-reperfusion (Wang et al, 1999). Pour cela, il était intéressant d'étudier un rôle protecteur possible de l'urée sur la survie des neurones P19 soumis au stress oxydatif. À cette fin, les neurones ont été cultivés en présence d'un milieu SNB appauvri en antioxydants (SNB (-AO)) afin d'isoler l'action de l'urée.

L'impact bénéfique de l'urée sur la viabilité des neurones P19 exposés à la solution KH ELS a été montré (Fig. 5.7). Le rôle protecteur de l'urée dans le modèle neuronal P19 est probablement dû à sa capacité de piégeage des EROs. En fait, il est connu que l'oxydation des phospholipides membranaires par des EROs est l'une des causes de maladies neurodégénératives. L'apparition de peroxydes de lipides et les activités enzymatiques antioxydantes diminuées se sont révélées étroitement liées à la formation de plaques séniles et aux enroulements neurofibrillaires dans les cerveaux (Pisoschi et

al, 2015). La carbonylation des protéines est également induite par le stress oxydatif dans le cortex frontal, pariétal et l'hippocampe des personnes ayant des maladies neurodégénératives (Hensley et al, 1996). Dans ce contexte, la possible action neuroprotectrice de l'urée pourrait être très importante. En fait, les résultats présentés montrent que les neurones peuvent pousser dans un milieu enrichi en urée qui peut les protéger contre les dommages causés par l'excès d'espèces pro-oxydantes. Cependant, d'autres recherches sont nécessaires pour évaluer le rôle réel de l'urée dans les systèmes biologiques.

## CONCLUSION

En conclusion, les résultats ont montré que si bien le Cu(II)Urée<sub>2</sub> et le Cu(II)Biuret<sub>2</sub> présentent une activité antioxydante *in vitro* mesurée par les tests DPPH et DEPDA, ils affectent la viabilité neuronale. Néanmoins, la cytotoxicité de ces complexes était plus faible par rapport aux concentrations équivalentes de CuCl<sub>2</sub>. Différemment du biuret, l'urée est biocompatible et a une action neuroprotectrice.

Les résultats obtenus peuvent être considérés comme innovateurs, en ajoutant de nouveaux points de vue sur l'urée qui était considérée un toxique pour la santé. En effet, en conditions de défaillance rénale, le sujet doit être soumis aux dialyses. La toxicité de l'urée est générée par des concentrations élevées d'urée (10-50 mM). La nouveauté des travaux dans le cadre de ce projet de maîtrise est que l'urée à des concentrations physiologiques (2.5-7.5 mM) présente une activité antioxydante et neuroprotectrice.

L'urée présente donc de propriétés antioxydantes considérables et de protection tissulaire. Wang et al (1999) ont montré une action cardioprotectrice de l'urée. Nos résultats récents montrent en plus, une action neuroprotectrice. Cet aspect est important considérant que les neurones sont particulièrement sensibles au stress oxydatif, l'une des causes de maladies neurodégénératives (Alzheimer et Parkinson). Pour de futurs travaux, il serait intéressant d'investiguer plus en détail le mécanisme par lequel l'urée est capable de protéger les cellules neuronales P19 ainsi en augmentant leur viabilité et croissance.



## ANNEXE 1

### CONTRIBUTIONS SCIENTIFIQUES DURANT LE PROJET DE MAÎTRISE

84<sup>e</sup> Congrès de l'Acfas.

Université du Québec à Montréal du 9 au 13 mai 2016

#### **Complexes de cuivre avec propriétés antioxydantes**

Mariela Gomez Perez\*, Pompilia Ispas-Szabo, Mircea Alexandru Mateescu

#### **Résumé**

Le cuivre est un élément essentiel pour le métabolisme humain et il est bien connu que sa carence entraîne divers troubles cliniques. Ce métal est essentiel à l'utilisation normale du fer et de différents enzymes. L'urée est le produit final contenant de l'azote le plus courant du catabolisme des protéines. Des études précédentes ont révélé les propriétés antioxydantes et cardioprotectrices de l'urée et ses dérivés ainsi que pour des protéines de cuivre (la céruloplasmine et les amineoxydases).

L'objectif principal de cette étude vise l'évaluation des propriétés antioxydantes des complexes de cuivre avec l'urée ( $\text{Cu(II)Urée}_2$ ) et biuret ( $\text{Cu(II)Biuret}_2$ ) ayant une masse moléculaire significativement plus faible que celles des métalloprotéines et qui présentent aussi une bonne biocompatibilité et stabilité dans des milieux physiologiques. La réponse des antioxydants aux différentes sources de radicaux peut varier dépendamment de la méthode d'évaluation.

Chaque complexe a été caractérisé structurellement et l'évaluation de l'activité antiradicalaire a été faite en utilisant la méthode colorimétrique N, N-diéthyl-p-phénylènediamine (DPD), la méthode TEAC modifiée (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity fast assay) ainsi que la méthode DPPH(2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl). Les données suggèrent que le complexe ( $\text{Cu(II)Biuret}_2$ ) présentait des propriétés antiradicalaires légèrement plus élevées par rapport au ( $\text{Cu(II)Urée}_2$ ) et indiquent un mécanisme de transfert de protons.

18th Annual Chemistry and Biochemistry Graduate Research Conference.  
Université de Concordia. 20 Novembre 2015.

### **Copper complexes with antioxidant properties**

Mariela Gomez Perez\*, Pompilia Ispas-Szabo, Mircea Alexandru Mateescu

#### **Abstract**

Cardiac dysfunctions were largely attributed to the adverse effects of reactive oxygen species (ROS). It has been reported that scavengers and antioxidants including copper proteins (ceruloplasmin and aminooxidase) and urea exert cardioprotective effects. This study proposes two coppers complex  $\text{Cu(II)Urea}_2$  and  $\text{Cu(II)Biuret}_2$  and the investigation of their radical scavenging activities. Each complex was synthesized and characterized structurally using spectral techniques (FTIR, X-Ray diffraction) and elemental analysis. Their antiradical activities were measured using the colorimetric method with N, N-diethyl-p-phenylenediamine (DPD) and the modified method TEAC (Trolox Equivalent Absorption Capacity) fast assay. The pro-oxidant species were generated by electrolysis. The results showed a good correlation between the concentration of the complexes and the anti-radical activity. The complex  $\text{Cu(II)Biuret}_2$  exhibited higher scavenging properties for free radicals compared with  $\text{Cu(II)Urea}_2$ . The data also supports the hypothesis of a mechanism based on proton transfer occurring in the studied systems.

## ANNEXE 2

### DONNÉES SUPPLEMENTAIRES SOUMISSES EN ANNEXE AU MANUSCRIT « L'URÉE ET SES COMPLEXES DE CUIVRE COMME AGENTS ANTIOXYDANTS ET NEUROPROTECTEURS » (CHAPITRE V)

#### ANALYSE DE LA STRUCTURE DU CU(II)UREA<sub>2</sub> ET DU CU (II)BIURET<sub>2</sub>

**Table A 2.1** Crystal data and structure refinement for C<sub>2</sub>H<sub>8</sub>Cl<sub>2</sub>CuN<sub>4</sub>O<sub>2</sub>

Empirical formula	C <sub>2</sub> H <sub>8</sub> Cl <sub>2</sub> CuN <sub>4</sub> O <sub>2</sub>
Formula weight	254.56
Temperature/K	100
Crystal system	monoclinic
Space group	P2 <sub>1</sub> /n
a/Å	3.7887(2)
b/Å	8.4675(4)
c/Å	12.4449(5)
α/°	90
β/°	92.467(3)
γ/°	90
Volume/Å <sup>3</sup>	398.87(3)
Z	2
ρ <sub>calc</sub> /cm <sup>3</sup>	2.120
μ/mm <sup>-1</sup>	18.698
F(000)	254.0
Crystal size/mm <sup>3</sup>	0.04 × 0.04 × 0.02
Radiation	GaKα (λ = 1.34139)
2θ range for data collection/°	10.998 to 121.146
Index ranges	-4 ≤ h ≤ 4, -10 ≤ k ≤ 10, 0 ≤ l ≤ 16
Reflections collected	906
Independent reflections	906 [R <sub>int</sub> = ?, R <sub>sigma</sub> = 0.0373]
Data/restraints/parameters	906/0/69
Goodness-of-fit on F <sup>2</sup>	1.563
Final R indexes [I ≥ 2σ (I)]	R <sub>1</sub> = 0.0509, wR <sub>2</sub> = 0.1490
Final R indexes [all data]	R <sub>1</sub> = 0.0534, wR <sub>2</sub> = 0.1498
Largest diff. peak/hole / e Å <sup>-3</sup>	0.51/-0.50

**Table A 2.2** Frequencies and assignation of characteristic bands of urea and Cu(II)Urea<sub>2</sub>

Assignment	Frequencies (cm <sup>-1</sup> )	
	Urea	Cu(II)Urea <sub>2</sub>
<b>N-H stretching</b>	3444	3461
	3348	3391
	3259	3355
		3307
		3229
<b>C=N</b>	2360	2361
	2336	2336
<b>v CO + NH<sub>2</sub> bending</b>	1680	1645
<b>NH<sub>2</sub> bending, v CO</b>	1602	1576
<b>v MO</b>		419

**Table A 2.3** Frequencies and assignation of characteristic bands of biuret and Cu(II)Biuret<sub>2</sub>

Assignment	Frequencies (cm <sup>-1</sup> )	
	Biuret	Cu(II)Biuret <sub>2</sub>
<b>N-H stretching</b>	3458	3430
	3048	3349
	3217	3248
		3178
	3016	2998
<b>v CO</b>	1718	1679
<b>NH<sub>2</sub> bending, v co</b>	1602	1577
<b>v CN antisymm.</b>	1419	1482
	1362	1360
<b>v MO</b>		490

**Table A 2.4.1** Bond Lengths for C<sub>2</sub>H<sub>8</sub>Cl<sub>2</sub>CuN<sub>4</sub>O<sub>2</sub>

Atom	Atom	Length/Å	Atom	Atom	Length/Å
Cu1	Cl1 <sup>1</sup>	2.9605(16)	Cu1	O1 <sup>3</sup>	1.955(4)
Cu1	Cl1	2.2921(15)	O1	C1	1.262(8)
Cu1	Cl1 <sup>2</sup>	2.9605(16)	N1	C1	1.324(8)
Cu1	Cl1 <sup>3</sup>	2.2921(15)	N2	C1	1.345(9)
Cu1	O1	1.955(4)			

Symmetry codes: <sup>-1</sup>+X,+Y,+Z; <sup>2</sup>-X,1-Y,1-Z; <sup>3</sup>1-X,1-Y,1-Z**Table A 2.4.2** Bond Angles for C<sub>2</sub>H<sub>8</sub>Cl<sub>2</sub>CuN<sub>4</sub>O<sub>2</sub>

Atom	Atom	Atom	Angle/°	Atom	Atom	Atom	Angle/°
Cl1	Cu1	Cl1 <sup>1</sup>	180.0	O1	Cu1	Cl1 <sup>3</sup>	95.39(13)
Cl1 <sup>1</sup>	Cu1	Cl1 <sup>2</sup>	91.42(5)	O1	Cu1	Cl1 <sup>2</sup>	84.61(13)
Cl1 <sup>2</sup>	Cu1	Cl1 <sup>3</sup>	180.0	O1 <sup>1</sup>	Cu1	Cl1	88.14(14)
Cl1 <sup>1</sup>	Cu1	Cl1 <sup>3</sup>	88.58(5)	O1 <sup>1</sup>	Cu1	Cl1 <sup>3</sup>	84.61(13)
Cl1	Cu1	Cl1 <sup>3</sup>	91.42(5)	O1	Cu1	O1 <sup>1</sup>	180.0
Cl1	Cu1	Cl1 <sup>2</sup>	88.58(5)	C1	O1	Cu1	133.6(4)
O1 <sup>1</sup>	Cu1	Cl1 <sup>2</sup>	95.39(13)	O1	C1	N1	118.9(6)
O1	Cu1	Cl1	91.86(14)	O1	C1	N2	123.0(6)
O1	Cu1	Cl1 <sup>1</sup>	88.14(14)	N1	C1	N2	118.1(6)
O1 <sup>1</sup>	Cu1	Cl1 <sup>1</sup>	91.86(14)				

Symmetry codes: <sup>1</sup>1-X,1-Y,1-Z; <sup>2</sup>2-X,1-Y,1-Z; <sup>3</sup>-1+X,+Y,+Z**Table A 2.4.3** Hydrogen Bonds for C<sub>2</sub>H<sub>8</sub>Cl<sub>2</sub>CuN<sub>4</sub>O<sub>2</sub>

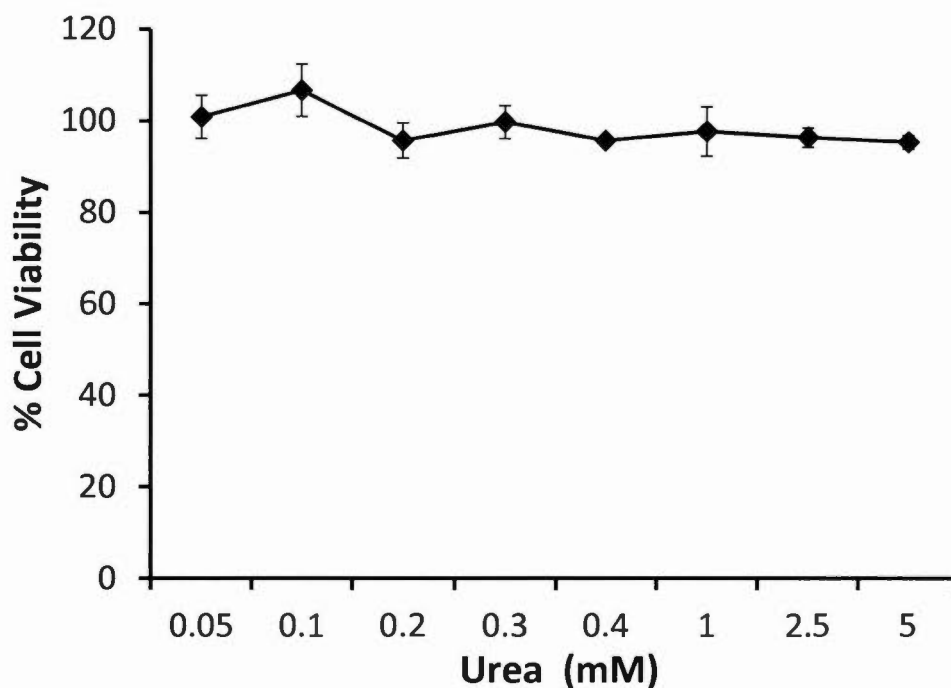
D	H	A	d(D-H)/Å	d(H-A)/Å	d(D-A)/Å	D-H-A/°
N1	H1A	N2 <sup>1</sup>	0.84(7)	2.46(7)	3.260(9)	160(6)
N1	H1B	Cl1 <sup>2</sup>	0.77(7)	2.58(7)	3.303(7)	158(6)
N2	H2A	Cl1 <sup>3</sup>	0.79(8)	2.50(8)	3.279(6)	169(8)
N2	H2B	O1 <sup>4</sup>	0.86(8)	2.46(8)	3.156(7)	138(7)

Symmetry codes: <sup>3/2</sup>-X,-1/2+Y,3/2-Z; <sup>2</sup>-1/2+X,3/2-Y,1/2+Z; <sup>3</sup>-1+X,+Y,+Z; <sup>4</sup>1/2-X,1/2+Y,3/2-Z

**Table A 2.4.4** Hydrogen Atom Coordinates ( $\text{\AA} \times 10^4$ ) and Isotropic Displacement Parameters ( $\text{\AA}^2 \times 10^3$ ) for  $\text{C}_2\text{H}_8\text{Cl}_2\text{CuN}_4\text{O}_2$

Atom	<i>x</i>	<i>y</i>	<i>z</i>	U(eq)
H1A	7840(180)	4450(80)	8320(50)	18(16)
H1B	6540(170)	5840(80)	8780(50)	15(16)
H2A	2500(200)	7250(90)	6740(60)	40(20)
H2B	3300(200)	7610(100)	7840(70)	40(20)

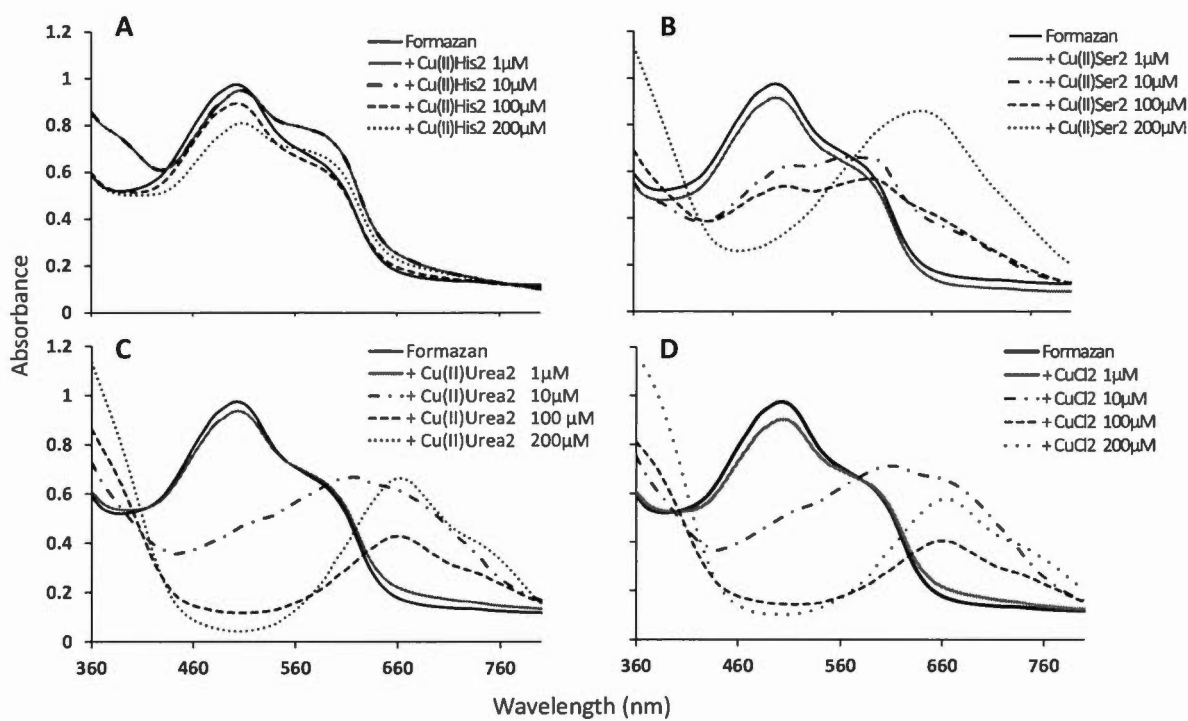
Symmetry codes:  $3/2-X, -1/2+Y, 3/2-Z$ ;  $2-1/2+X, 3/2-Y, 1/2+Z$ ;  $3-1+X, +Y, +Z$ ;  $4/2-X, 1/2+Y, 3/2-Z$



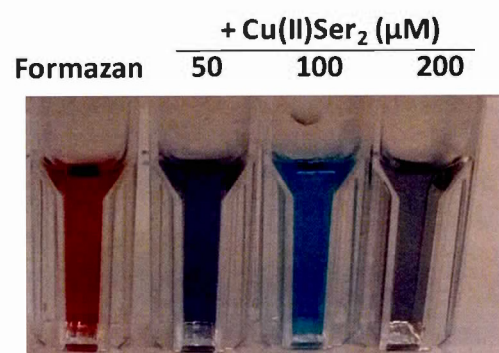
**Figure A 2.1** Concentration-dependent effects of urea in cell viability per the NR assay. Day 4, P19 neurons were incubated 48 hours with urea at different concentrations. Values are presented as means  $\pm$  SEM ( $n = 3$ ).

### ANNEXE 3

## DONNÉES SUPPLEMENTAIRES ANNEXÉES AU MANUSCRIT « LE TEST ROUGE NEUTRE VERSUS MTT POUR LE DOSAGE DE LA VIABILITÉ CELLULAIRE EN PRÉSENCE DE COMPOSÉS CUIVRIQUES » (CHAPITRE VI)



**Figure A 3.1** Spectrophotometric profiles of formazan in the presence of various concentrations of Cu(II)His<sub>2</sub> (A), Cu(II)Ser<sub>2</sub> (B), Cu(II)Urea<sub>2</sub> (C) and CuCl<sub>2</sub> (D) *in vitro*.



**Figure A 3.2** Changes in the color of formazan solution upon addition of Cu(II)Ser<sub>2</sub>.



## BIBLIOGRAPHIE

- Alberti, A., Bolognini, L., Macciantelli, D., & Caratelli, M. (2000). The radical cation of N, N-diethyl-para-phenylendiamine: a possible indicator of oxidative stress in biological samples. *Research on Chemical Intermediates*, 26(3), 253-267.
- Apak, R., Özyürek, M., Güçlü, K., Çapanoğlu, E. (2016). Antioxidant activity/capacity measurement. 2. Hydrogen atom transfer (HAT)-based, mixed-mode (electron transfer (ET)/HAT), and lipid peroxidation assays. *Journal of agricultural and food chemistry*, 64, 1028-1045.
- Aquilano, K., Baldelli, S., Ciriolo, M. R. (2014). Glutathione: new roles in redox signaling for an old antioxidant. *Frontiers in pharmacology*, 5.
- Atanasiu, R. L.; Stea, D.; Mateescu, M.A; Vergely, C.; Dalloz, F.; Briot, F.; Maupoil, V.; Nadeau, R.; Rochette, L. (1998). Direct evidence of caeruloplasmin antioxidant properties. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 189, 127-135.
- Atkinson, D. E. (1992). Functional roles of urea synthesis in vertebrates. *Physiological zoology*, 65, 243-267.
- Bao, B. Y., Ting, H. J., Hsu, J. W., Lee, Y. F. (2008). Protective role of 1 $\alpha$ , 25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> against oxidative stress in nonmalignant human prostate epithelial cells. *International Journal of Cancer*, 122, 2699-2706.
- Battault, S., Whiting, S. J., Peltier, S. L., Sadrin, S., Gerber, G., Maixent, J. M. (2013). Vitamin D metabolism, functions and needs: from science to health claims. *European journal of nutrition*, 52, 429-441.
- Bennett, L. E. (1970). Synthesis and characterization of urea complexes of cobalt (III). *Inorganic Chemistry*, 9, 1941-1942.
- Bento, I., Peixoto, C., Zaitsev, V. N., Lindley, P. F. (2007). Ceruloplasmin revisited: structural and functional roles of various metal cation-binding sites. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 63, 240-248.

- Berridge MV, Tan AS, McCoy KD, Wang R.(1996). The biochemical and cellular basis of cell proliferation assays that use tetrazolium salts. *Biochemica*. 4, 14–19.
- Berry, C. E., Hare, J. M. (2004). Xanthine oxidoreductase and cardiovascular disease: molecular mechanisms and pathophysiological implications. *The Journal of physiology*, 555, 589-606.
- Bouchard, F., Paquin, J. (2009). Skeletal and cardiac myogenesis accompany adipogenesis in P19 embryonal stem cells. *Stem cells and development*, 18, 1023-1032.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., Berset, C. L. W. T. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food science and Technology*, 28, 25-30.
- Brugisser R, Von Daeniken K, Jundt G, Schaffner W, Tullberg-Reinert H. (2002). Interference of plant extracts, phytoestrogens and antioxidants with the MTT tetrazolium assay. *Planta Medica*, 68, 445–448.
- Buffoni, F., Ignesti, G. (2000). The copper-containing amine oxidases: biochemical aspects and functional role. *Molecular genetics and metabolism*, 71, 559-564.
- Burg, M. B., Ferraris, J. D., Dmitrieva, N. I. (2007). Cellular response to hyperosmotic stresses. *Physiological reviews*, 87, 1441-1474.
- Cadenas, E., Packer, L.(1996) *Handbook of antioxidants*. New York, Marcel Dekker.
- Cadet, N., Paquin, J. (2000). Conversion and storage of somatostatin are established before response to secretagogue stimuli in P19 neurons. *Developmental Brain Research*, 120, 211-221
- Caillet, S., Côté, J., Doyon, G., Sylvain, J. F., Lacroix, M. (2011). Antioxidant and antiradical properties of cranberry juice and extracts. *Food Research International*, 44, 1408-1413.

- Campbell, J. W. (1997). Mitochondrial ammonia metabolism and the proton-neutral theory of hepatic ammonia detoxication. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology*, 278, 308-321.
- Carocho, M., Ferreira, I. C. (2013). A review on antioxidants, pro-oxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology*, 51, 15-25.
- Chakrabarti, R., Kundu, S., Kumar, S., Chakrabarti, R. (2001). Vitamin A as an enzyme that catalyzes the reduction of MTT to formazan by vitamin C. *Journal of cellular biochemistry*, 80, 133-138.
- Charache, S., Terrin, M. L., Moore, R. D., Dover, G. J., Barton, F. B., Eckert, S. V., McMahon, R. P.; Bonds, D. R. (1995). Investigators of the Multicenter Study of Hydroxyurea in Sickle Cell Anemia. Effect of hydroxyurea on the frequency of painful crises in sickle cell anemia. *N Engl J Med*, 332, 1317-1322.
- Chen, M. H., Chen, Z., Song, B. A., Bhadury, P. S., Yang, S., Cai, X. J., and Zeng, S. (2009). Synthesis and antiviral activities of chiral thiourea derivatives containing an  $\alpha$ -aminophosphonate moiety. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57, 1383-1388.
- Chow, C. K. (1988). Interrelationships of cellular antioxidant defense systems. *Cellular antioxidant defense mechanisms*, 2, 217-237.
- Cohen, D. M., Gullans, S. R., Chin, W. W. (1996). Urea signaling in cultured murine inner medullary collecting duct (mIMCD3) cells involves protein kinase C, inositol 1, 4, 5-trisphosphate (IP3), and a putative receptor tyrosine kinase. *Journal of Clinical Investigation*. 97, 1884.
- Cokic, V.P.; Smith, R.D.; Beleslin-Cokic, B.B.; Njoroge, J.M.; Miller, J.L.; Gladwin, M.T.; Schechter, A.N. ( 2003). Hydroxyurea Induces Fetal Hemoglobin by the Nitric Oxide-Dependent Activation of Soluble Guanylyl Cyclase. *Journal of Clinical Investigation*. 111, 231–239.
- Cordero, B., Gómez, V., Platero-Prats, A. E., Revés, M., Echeverría, J., Cremades, E., Alvarez, S. (2008). Covalent radii revisited. *Dalton Transactions*, 2832-2838.

- Crisponi, G.; Nurchi, V.M.; Fanni, D.; Gerosa, C.; Nemolato, S.; Faa, G. (2010) Copper-related diseases: from chemistry to molecular pathology. *Coordination Chemistry Reviews*. 254, 876–889.
- Currier, T. A.; Bohnert, D. W.; Falck, S. J.; Bartle, S. J. (2004). Daily and alternate day supplementation of urea or biuret to ruminants consuming low-quality forage: I. Effects on cow performance and the efficiency of nitrogen use in wethers. *Journal of Animal Science*. 82, 1508-1517.
- Davidson, B., Soodak, M., Strout, H. V., Neary, J. T., Nakamura, C., and Maloof, F. (1979). Thiourea and cyanamide as inhibitors of thyroid peroxidase: the role of iodide. *Endocrinology*, 104, 919-924.
- Davies, B.W.; Kohanski, M.A.; Simmons, L.A.; Winkler, J.A.; Collins, J.J.; Walker, G.C. (2009). Hydroxyurea Induces Hydroxyl Radical-Mediated Cell Death in *Escherichia coli*. *Molecular Cell*, 36, 845–860.
- De Bandt, J. P., Moinard, C., Cynober, L. (2006). Métabolisme et fonctions des polyamines. *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée*, 21, 333-341.
- Decaux, G. (2001). Long-term treatment of patients with inappropriate secretion of antidiuretic hormone by the vasopressin receptor antagonist conivaptan, urea, or furosemide. *The American journal of medicine*, 110, 582-584.
- Descamps-Latscha, B., Drüeke, T., Witko-Sarsat, V. (2001). Dialysis-induced oxidative stress: biological aspects, clinical consequences, and therapy. In *Seminars in dialysis*. Blackwell Science Inc, 14, 193-199.
- Deschamps, P., Kulkarni, P. P., Gautam-Basak, M., Sarkar, B. (2005). The saga of copper (II)–l-histidine. *Coordination chemistry reviews*. 249, 895-909.
- Dolomanov, O. V., Bourhis, L. J., Gildea, R. J., Howard, J. A., Puschmann, H. (2009). OLEX2: a complete structure solution, refinement and analysis program. *Journal of Applied Crystallography*, 42, 339-341.

- Du, J., Cullen, J. J., Buettner, G. R. (2012). Ascorbic acid: chemistry, biology and the treatment of cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1826, 443-457.
- Ducharme, P., Maltais, D., Desroches, D., Mateescu, M. A., Paquin, J. (2010). Ceruloplasmin-induced aggregation of P19 neurons involves a serine protease activity and is accompanied by reelin cleavage. *Neuroscience*, 167, 633-643.
- Duchesne, R., Klein, J. D., Velotta, J. B., Doran, J. J., Rouillard, P., Roberts, B. R., Sands, J. M. (2001). UT-A Urea Transporter Protein in Heart. *Circulation research*, 89, 139-145.
- Dumoulin, M. J., Chahine, R., Atanasiu, R., Nadeau, R., Mateescu, M. A. (1996). Comparative antioxidant and cardioprotective effects of ceruloplasmin, superoxide dismutase and albumin. *Arzneimittel-forschung*, 46, 855-861.
- Englard, S., Seifter, S. (1986). The biochemical functions of ascorbic acid. *Annual review of nutrition*, 6, 365-406.
- Fischer, J., Prosenc, M. H., Wolff, M., Hort, N., Willumeit, R., Feyerabend, F. (2010). Interference of magnesium corrosion with tetrazolium-based cytotoxicity assays. *Acta Biomaterialia*, 6, 1813-1823.
- Flora, S. J. (2009). Structural, chemical and biological aspects of antioxidants for strategies against metal and metalloid exposure. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2, 191-206.
- Forslund, A. H., El-Khoury, A. E., Olsson, R. M., Sjödin, A. M., Hambraeus, L., Young, V. R. (1999). Effect of protein intake and physical activity on 24-h pattern and rate of macronutrient utilization. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 276, E964-E976.
- Fotakis, G., Timbrell, J. A. (2006). *In vitro* cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicology letters*, 160, 171-177.

- Fouillet, H., Juillet, B., Bos, C., Mariotti, F., Gaudichon, C., Benamouzig, R., Tomé, D. (2008). Urea-nitrogen production and salvage are modulated by protein intake in fed humans: results of an oral stable-isotope-tracer protocol and compartmental modeling. *The American journal of clinical nutrition*, 87, 1702-1714.
- Fox, R. B., Harada, R. N., Tate, R. M., Repine, J. E. (1983). Prevention of thiourea-induced pulmonary edema by hydroxyl-radical scavengers. *Journal of Applied Physiology*, 55, 1456-1459.
- Frankel, E. N., Finley, J. W. (2008). How to standardize the multiplicity of methods to evaluate natural antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 4901-4908.
- Freeman, H. T., Smith, J. E. W. L. (1966). Crystallographic studies of the biuret reaction. II. Structure of bis-biuret-copper (II) dichloride,  $\text{Cu}(\text{NH}_2\text{CONHCONH}_2)_2\text{Cl}_2$ . *Acta Crystallographica*, 20, 153-159.
- Gangopadhyay, D., Singh, S. K., Sharma, P., Mishra, H., Unnikrishnan, V. K., Singh, B., & Singh, R. K. (2016). Spectroscopic and structural study of the newly synthesized heteroligand complex of copper with creatinine and urea. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 154, 200-206.
- Gerschman, R., Gilbert, D. L., Nye, S. W., Dwyer, P., Fenn, W. O. (1954). Oxygen poisoning and x-irradiation: a mechanism in common. *Science*, 119, 623-626.
- Gomez, P. M., Fourcade, L., Mateescu, M. A., Paquin, J. (2017). Neutral Red versus MTT assay of cell viability in the presence of copper compounds. *Analytical Biochemistry*, 535, 43-46.
- Goodgame, M., Hussain, I. (1989). Synthesis and spectroscopic studies of the complexes of biuret with alkaline earth metal halides. *Inorganica chimica acta*, 160, 183-188.
- Goodman, B. E. (2002). Transport of small molecules across cell membranes: water channels and urea transporters. *Advances in Physiology Education*, 26, 146-157.

- Halliwell, B. (1978). Superoxide-dependent formation of hydroxyl radicals in the presence of iron chelates: is it a mechanism for hydroxyl radical production in biochemical systems?. *FEBS Letters*, 92, 321-326.
- Halliwell, B. (1995). Antioxidant characterization: methodology and mechanism. *Biochemical pharmacology*, 49, 1341-1348.
- Halliwell, B. (2007). Biochemistry of oxidative stress. *Biochemical Society Transactions*, 35, 1147-1150.
- Harris, Z. L., Gitlin, J. D. (1996). Genetic and molecular basis for copper toxicity. *The American journal of clinical nutrition*, 63, 836S-841S.
- Hensley, K., Butterfield, D. A., Hall, N., Cole, P., Subramaniam, R., Mark, R., Aksenova, M. (1996). Reactive Oxygen Species as Causal Agents in the Neurotoxicity of the Alzheimer's Disease-Associated Amyloid Beta Peptide. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 786, 120-134.
- House, K. A., House, J. E. (2017). Thermodynamics of dissolution of urea in water, alcohols, and their mixtures. *Journal of Molecular Liquids*, 242, 428-432.
- Hsu, C. H., Kurtz, T. W., Massari, P. U., Ponze, S. A., Chang, B. S. (1978). Familial azotemia: Impaired urea excretion despite normal renal function. *New England Journal of Medicine*, 298, 117-121.
- Huang, D., Ou, B., Prior, R. L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53, 1841-1856.
- Instruments, B. T., Winooski, V. (2007). Serum albumin leads to false-positive results in the XTT and the MTT assay. *Biotechniques*, 43, 178-186.
- Jackson, C. V., Mickelson, J. K., Stringer, K., Rao, P. S., Lucchesi, B. R. (1986). Electrolysis-induced myocardial dysfunction: a novel method for the study of free radical mediated tissue injury. *Journal of pharmacological methods*, 15, 305-320.

- Jembrek, M. J., Vlainić, J., Radovanović, V., Erhardt, J., Oršolić, N. (2014). Effects of copper overload in P19 neurons: impairment of glutathione redox homeostasis and crosstalk between caspase and calpain protease systems in ROS-induced apoptosis. *Biometals*, 27, 1303-1322.
- Jimenez-Alvarez, D., Giuffrida, F., Vanrobaeys, F., Golay, P. A., Cotting, C., Lardeau, A., Keely, B. J. (2008). High-throughput methods to assess lipophilic and hydrophilic antioxidant capacity of food extracts *in vitro*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 3470–3477.
- Kengne, F. G., Couturier, B. S., Soupart, A., Decaux, G. (2015). Urea minimizes brain complications following rapid correction of chronic hyponatremia compared with vasopressin antagonist or hypertonic saline. *Kidney international*, 87, 323-331.
- Kettani, T; Gulbis, B; Ferster, A; Kumps, A (2009). Plasma hydroxyurea determined by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*. 877, 446–450.
- King, S. B. (2004). Nitric oxide production from hydroxyurea. *Free Radical Biology and Medicine*, 37, 737-744.
- Konan, K. V., Le Tien, C., & Mateescu, M. A. (2016). Electrolysis-induced fast activation of the ABTS reagent for an antioxidant capacity assay. *Analytical Methods*, 8, 5638-5644.
- Kovacic, P. (2011). Hydroxyurea (therapeutics and mechanism): metabolism, carbamoyl nitroso, nitroxyl, radicals, cell signaling and clinical applications. *Medical hypotheses*, 76, 24-31.
- Krinsky, N. I. (1989). Antioxidant functions of carotenoids. *Free Radical Biology and Medicine*, 7, 617-635.
- Kumar, V., Abbas, A. K., Aster, J. C. (2017). *Robbins Basic Pathology E-Book*. Elsevier Health Sciences.
- Lehninger, A. L., Cox, M. M., Nelson, D. L. (1994). *Principes de biochimie*. Flammarion, Médecine-Sciences, 2e éd.p 576



- Li, X., Chen, G., Yang, B. (2012). Urea transporter physiology studied in knockout mice. *Frontiers in physiology*, 3, 217.
- Lim, S. W., Loh, H. S., Ting, K. N., Bradshaw, T. D., Allaudin, Z. N. (2015). Reduction of MTT to purple formazan by vitamin E isomers in the absence of cells. *Tropical life sciences research*, 26, 111.
- Lü, L., Zhang, L., Wai, M. S. M., Yew, D. T. W., Xu, J. (2012). Exocytosis of MTT formazan could exacerbate cell injury. *Toxicology in Vitro*, 26, 636-644.
- Lúcio, M., Nunes, C., Gaspar, D., Ferreira, H., Lima, J. L., Reis, S. (2009). Antioxidant activity of vitamin E and trolox: understanding of the factors that govern lipid peroxidation studies *in vitro*. *Food Biophysics*, 4, 312-320.
- Lukash, A. I., Kartashev, I. P., Antipina, T. V. (1980). Participation of iron ions in antioxidant action of urea. *Ukrainskii biokhimicheskii zhurnal* (1978), 52, 462.
- MacPherson, P. A., McBurney, M. W. (1995). P19 embryonal carcinoma cells: a source of cultured neurons amenable to genetic manipulation. *Methods*, 7, 238-252.
- Maltais, D., Desroches, D., Aouffen, M., Mateescu, M. A., Wang, R., Paquin, J. (2003). The blue copper ceruloplasmin induces aggregation of newly differentiated neurons: a potential modulator of nervous system organization. *Neuroscience*, 121, 73-82.
- Manzocco, L., Anese, M., Nicoli, M. C. (1998). Antioxidant properties of tea extracts as affected by processing. *LWT-Food Science and Technology*, 31, 694-698.
- Masella, R., Di Benedetto, R., Vari, R., Filesi, C., Giovannini, C. (2005). Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *The Journal of nutritional biochemistry*, 16, 577-586.
- Mateescu, M. A., Dumoulin, M. J., Wang, X. T., Nadeau, R., Mondovi, B. (1997). A new physiological role of copper amine oxidases: cardioprotection against reactive oxygen intermediates. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 48(SUPPL. 2), 110-121.

- May, J. M. (2012). Vitamin C transport and its role in the central nervous system. In *Water Soluble Vitamins*. Springer Netherlands. 85-103
- McBurney, M. (2003). P19 embryonal carcinoma cells. *International Journal of Developmental Biology*, 37, 135-140.
- Meijer, A. J., Lamers, W. H., Chamuleau, R. (1990). Nitrogen metabolism and ornithine cycle function. *Physiological Reviews*, 70, 701-748.
- Minyu, Z. Y. T. N. T.; Dinbo, Y. G. W. (1986) Synthesis and characterization of the solid complex between lanthanide nitrate with biuret. *Chinese Journal of Inorganic Chemistry*, 3, 010.
- Mishra, K., Ojha, H., Chaudhury, N. K. (2012). Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results. *Food chemistry*, 130, 1036-1043.
- Misiaszek, R., Crean, C., Joffe, A., Geacintov, N. E., Shafirovich, V. (2004). Oxidative DNA damage associated with combination of guanine and superoxide radicals and repair mechanisms via radical trapping. *Journal of Biological Chemistry*, 279, 32106-32115.
- Molski, M., Konarski, J. (2006). Neuronal differentiation and synapse formation in the space-time with temporal fractal dimension. *Synapse*, 60, 567-572.
- Mondovi, B; Riccio, P. (1990). Copper amine oxidases: Current state of knowledge. *Biology of Metals*. 3, 110-113.
- Moore, H. E., Garmendia, M. J., Cooper, W. J. (1984). Kinetics of monochloramine oxidation of N, N-diethyl-p-phenylenediamine. *Environmental science & technology*, 18, 348-353.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*, 65, 55-63.

- Nakamoto, K., Nakamoto, K. (1977). Infrared and Raman spectra of inorganic and coordination compounds. Wiley.
- Nakayashiki, T., Mori, H. (2013). Genome-wide screening with hydroxyurea reveals a link between nonessential ribosomal proteins and reactive oxygen species production. *Journal of bacteriology*, 195, 1226-1235.
- Nanduri, J., Vaddi, D. R., Khan, S. A., Wang, N., Makerenko, V., Prabhakar, N. R. (2013). Xanthine oxidase mediates hypoxia-inducible factor-2 $\alpha$  degradation by intermittent hypoxia. *PLoS One*, 8, e75838.
- Natarajan, M., Mohan, S., Martinez, B. R., Meltz, M. L., Herman, T. S. (1999). Antioxidant compounds interfere with the 3. *Cancer detection and prevention*, 24, 405-414.
- Naumov, D. Y., Yufit, D. S., Boldyreva, E. V., & Howard, J. A. (2001). A urea complex of copper (II) hypophosphite at 293, 100 and 15 K. *Acta Crystallographica Section C: Crystal Structure Communications*, 57, 790-792.
- Niki, E. (2010). Assessment of antioxidant capacity *in vitro* and *in vivo*. *Free Radical Biology and Medicine*, 49, 503-515.
- Nikkhah, G., Tonn, J. C., Hoffmann, O., Kraemer, H. P., Darling, J. L., Schachenmayr, W., Schönmayr, R. (1992). The MTT assay for chemosensitivity testing of human tumors of the central nervous system. *Journal of neuro-oncology*, 13, 13-24.
- Ning, T., Minyu, T., Yingli, Z., & Keming, W. (1986). Synthesis and characterization of the solid complex of thorium nitrate with biuret. *Journal of Lanzhou University*, 1.
- Packer, L. (1991). Protective role of vitamin E in biological systems. *The American journal of clinical nutrition*, 53, 1050S-1055S.
- Padh, H. (1990). Cellular functions of ascorbic acid. *Biochemistry and Cell Biology*, 68, 1166-1173.

- Papariello, G. J., Janish, M. A. M. (1966). Diphenylpicrylhydrazyl as an Organic Analytical Reagent in the Spectrophotometric Analysis of Phenols. *Analytical Chemistry*, 38, 211-214.
- Paquin, J., Danalache, B. A., Jankowski, M., McCann, S. M., Gutkowska, J. (2002). Oxytocin induces differentiation of P19 embryonic stem cells to cardiomyocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99, 9550-9555.
- Paradis, M., Gagné, J., Mateescu, M.-A., Paquin, J. (2010). The effects of nitric oxide-oxidase and putative glutathione-peroxidase activities of ceruloplasmin on the viability of cardiomyocytes exposed to hydrogen peroxide. *Free Radical Biology and Medicine*, 49, 2019-2027.
- Pastore, A., Federici, G., Bertini, E., Piemonte, F. (2003). Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. *Clinica chimica acta*, 333, 19-39.
- Peng, L., Wang, B., Ren, P. (2005). Reduction of MTT by flavonoids in the absence of cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 45, 108-111.
- Pham-Huy, L. A., He, H., Pham-Huy, C. (2008). Free radicals, antioxidants in disease and health. *International journal of biomedical science: IJBS*, 4, 89.
- Pisoschi, A. M., Pop, A. (2015). The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: a review. *European journal of medicinal chemistry*, 97, 55-74.
- Pop, V.; Kriza, A.; Ilis, M. Synthesis and stability studies in physiological-like conditions of two urea complexes of copper (II) and manganese (II). *An. Univ. Bucuresti. Chim.* 2002, 2, 63-68.
- Popovici, C., Saykova, I., Tylkowski, B. (2010). Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH.
- Prasad, A. K., Mishra, P. C. (2017). Scavenging of superoxide radical anion and hydroxyl radical by urea, thiourea, selenourea and their derivatives without any catalyst: A theoretical study. *Chemical Physics Letters*, 684, 197-204.

- Prior, R. L., Wu, X., Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53, 4290-4302.
- Puglia, C. D., Powell, S. R. (1984). Inhibition of cellular antioxidants: a possible mechanism of toxic cell injury. *Environmental health perspectives*, 57, 307.
- Radovanovic, B. S., Premovic, P. I. (1992). Thermal behaviour of Cu (II)-urea complex. *Journal of thermal analysis*, 38, 715-719.
- Raptis, S. G., Anastassopoulou, J., Theophanides, T. (2000). Vibrational and theoretical studies of urea and magnesium-urea complexes. *Theoretical Chemistry Accounts: Theory, Computation, and Modeling (Theoretica Chimica Acta)*, 105, 156-164.
- Reddy, S. T., Wang, C.-Y., Sakhaee, K., Brinkley, L., Pak, C. Y. (2002). Effect of low-carbohydrate high-protein diets on acid-base balance, stone-forming propensity, and calcium metabolism. *American Journal of Kidney Diseases*, 40, 265-274.
- Repetto, G., Del Peso, A., Zurita, J. L. (2008). Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nature protocols*, 3, 1125.
- Rezk, B. M., Haenen, G. R., van der Vijgh, W. J., Bast, A. (2004). The extraordinary antioxidant activity of vitamin E phosphate. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1683, 16-21.
- Richards, P., Brown, C. (1975). Urea metabolism in an azotaemic woman with normal renal function. *The Lancet*, 306, 207-209.
- Riss, T. L., Moravec, R. A., Niles, A. L., Duellman, S., Benink, H. A., Worzella, T. J., & Minor, L. (2016). Cell viability assays.
- Ross, L., Barclay, C., Artz, J. D., Mowat, J. J. (1995). Partitioning and antioxidant action of the water-soluble antioxidant, Trolox, between the aqueous and lipid phases of phosphatidylcholine membranes: <sup>14</sup>C tracer and product studies. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1237, 77-85.

- Rostkowska, H., Lapinski, L., Khvorostov, A., & Nowak, M. J. (2003). Proton-Transfer Processes in Thiourea: UV Induced Thione→ Thiol Reaction and Ground State Thiol→ Thione Tunneling. *The Journal of Physical Chemistry A*, 107, 6373-6380.
- Rudnicki, M.A. et McBumey, M.W. (1987). Cell culture methods and induction of differentiation of embryonal carcinoma cell lines. *Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach*, 19-49.
- Sachs, G., Kraut, J., Wen, Y., Feng, J., Scott, D. (2006). Urea transport in bacteria: acid acclimation by gastric *Helicobacter* spp. *The Journal of membrane biology*, 212, 71-82.
- Sands, J. (2003). Molecular mechanisms of urea transport. *The Journal of membrane biology*, 191, 149-163.
- Sardar, S., Chakraborty, A., Chatterjee, M. (1995). Comparative effectiveness of vitamin D3 and dietary vitamin E on peroxidation of lipids and enzymes of the hepatic antioxidant system in Sprague-Dawley rats. *International journal for vitamin and nutrition research. Journal international de vitaminologie et de nutrition*, 66, 39-45.
- Schaich, K. M., Tian, X., Xie, J. (2015). Hurdles and pitfalls in measuring antioxidant efficacy: a critical evaluation of ABTS, DPPH, and ORAC assays. *Journal of functional foods*, 14, 111-125.
- Seth, R., Yang, S., Choi, S., Sabeen, M., Roberts, E. A. (2004). *In vitro* assessment of copper-induced toxicity in the human hepatoma line, Hep G2. *Toxicology in Vitro*, 18, 501-509.
- Shankar, V., Pandeya, S. N. (1981). Synthesis of a series of new N1-[4-(4-nitrophenylthio) phenyl]-N3-(H/alkyl/acyl/aryl) thioureas and their antifungal, insecticidal and larvicidal activities. *Arzneimittel-Forschung*, 31, 753-756.
- Sheldrick, G. M. (2008). A short history of SHELX. *Acta Crystallographica Section A: Foundations of Crystallography*, 64, 112-122.

- Sheldrick, G. M. (2015). SHELXT–Integrated space-group and crystal-structure determination. *Acta Crystallographica Section A: Foundations and Advances*, 71, 3-8.
- Shim, H., Harris, Z. L. (2003). Genetic defects in copper metabolism. *The Journal of nutrition*. 133, 1527S-1531S.
- Sies, H. (1991). Oxidative stress: from basic research to clinical application. *The American journal of medicine*, 91, S31-S38.
- Singh, A., Xu, Y. J. (2016). The cell killing mechanisms of hydroxyurea. *Genes*, 7, 99.
- Smith, C. P. (2009). Mammalian urea transporters. *Experimental physiology*, 94, 180-185.
- Smith, P. B., Crespi, C. (2002). Thiourea toxicity in mouse C3H/10T12 cells expressing human flavin-dependent monooxygenase 3. *Biochemical pharmacology*, 63, 1941-1948.
- Sofic, E., Rustembegovic, A., Kroyer, G., Cao, G. (2002). Serum antioxidant capacity in neurological, psychiatric, renal diseases and cardiomyopathy. *Journal of neural transmission*, 109, 711-719.
- Soupart, A., Decaux, G. (1996). Therapeutic recommendations for management of severe hyponatremia: current concepts on pathogenesis and prevention of neurologic complications. *Clinical nephrology*. 46, 149-169.
- Soupart, A., Schroöder, B., Decaux, G. (2007). Treatment of hyponatraemia by urea decreases risks of brain complications in rats. Brain osmolyte contents analysis. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 22, 1856-1863.
- Soupart, A., Silver, S., Schroöder, B., Sterns, R., & Decaux, G. (2002). Rapid (24-hour) reaccumulation of brain organic osmolytes (particularly myo-inositol) in azotemic rats after correction of chronic hyponatremia. *Journal of the American Society of Nephrology*, 13(6), 1433-1441.

- Soupart, A., Stenuit, A., Perier, O., Decaux, G. (1991). Limits of brain tolerance to daily increments in serum sodium in chronically hyponatraemic rats treated with hypertonic saline or urea: advantages of urea. *Clinical science*, 80, 77-84.
- Spector, R., Johanson, C. E. (2014). The nexus of vitamin homeostasis and DNA synthesis and modification in mammalian brain. *Molecular brain*, 7, 3
- Stim, J., Shaykh, M., Anwar, F., Ansari, A., Arruda, J. A., Dunea, G. (1995). Factors determining hemoglobin carbamylation in renal failure. *Kidney international*, 48, 1605-1610.
- Stockert, J. C., Blázquez-Castro, A., Cañete, M., Horobin, R. W., Villanueva, Á. (2012). MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. *Acta histochemica*, 114, 785-796.
- Sung, C. C., Hsu, Y. C., Chen, C. C., Lin, Y. F., Wu, C. C. (2013). Oxidative stress and nucleic acid oxidation in patients with chronic kidney disease. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2013.
- Tabart, J., Kevers, C., Pincemail, J., Defraigne, J. O., Dommes, J. (2009). Comparative antioxidant capacities of phenolic compounds measured by various tests. *Food Chemistry*, 113, 1226-1233.
- Talorete, T. P., Bouaziz, M., Sayadi, S., Isoda, H. (2006). Influence of medium type and serum on MTT reduction by flavonoids in the absence of cells. *Cytotechnology*, 52, 189-198.
- Tan, J. B. L., Lim, Y. Y. (2015). Critical analysis of current methods for assessing the *in vitro* antioxidant and antibacterial activity of plant extracts. *Food chemistry*, 172, 814-822.
- Theophanides, T., Harvey, P. D. (1987). Structural and spectroscopic properties of metal-urea complexes. *Coordination Chemistry Reviews*, 76, 237-264.
- Traber, M. G., Atkinson, J. (2007). Vitamin E, antioxidant and nothing more. *Free Radical Biology and Medicine*, 43, 4-15.



- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M., Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 39, 44-84.
- Vistica DT, Skehan P, Scudiero D, Monks A, Pittman A, Boyd MR. (1991) Tetrazoliumbased assays for cellular viability: a critical examination of selected parameters affecting formazan production. *Cancer Research*, 51, 2515–2520.
- Wang P, Henning SM, Heber D. (2006). Limitations of MTT and MTS-based assays for measurements of antiproliferative activity of green tea polyphenols. *PLoS One.*, 5, 1–10.
- Wang, M. L., Zhong, G. Q., Chen, L. (2016). Synthesis, Optical Characterization, and Thermal Decomposition of Complexes Based on Biuret Ligand. *International Journal of Optics*, 2016.
- Wang, S., Yu, H., Wickliffe, J. K. (2011). Limitation of the MTT and XTT assays for measuring cell viability due to superoxide formation induced by nano-scale TiO<sub>2</sub>. *Toxicology in Vitro*, 25, 2147-2151.
- Wang, X., Wu, L., Mateescu, M. A., Nadeau, R., Wang, R. (1999). Novel cardiac protective effects of urea: from shark to rat. *British journal of pharmacology*, 128, 1477-1484.
- Webster, G. C., Berner, R. A., Gansa, A. N. (1957). The Effect of Biuret on Protein Synthesis in Plants. *Plant physiology*, 32, 60.
- Weiner, I. D., Mitch, W. E., Sands, J. M. (2015). Urea and ammonia metabolism and the control of renal nitrogen excretion. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 10, 1444-1458.
- Willcox, J. K., Ash, S. L., Catignani, G. L. (2004). Antioxidants and prevention of chronic disease. *Critical reviews in food science and nutrition*, 44, 275-295.
- Wiseman, H. (1993). Vitamin D is a membrane antioxidant Ability to inhibit iron-dependent lipid peroxidation in liposomes compared to cholesterol, ergosterol and tamoxifen and relevance to anticancer action. *FEBS letters*, 326, 285-288.

- Xie, J., Schaich, K. M. (2014). Re-evaluation of the 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl free radical (DPPH) assay for antioxidant activity. *Journal of agricultural and food chemistry*, 62(19), 4251-4260.
- York, J. L., Maddox, L. C., Zimniak, P., McHugh, T. E., Grant, D. F. (1998). Reduction of MTT by glutathione S-transferase. *Biotechniques*, 25, 622-624
- Young, V. R., El-Khoury, A. E., Raguso, C. A., Forslund, A. H., Hambraeus, L. (2000). Rates of urea production and hydrolysis and leucine oxidation change linearly over widely varying protein intakes in healthy adults. *The Journal of nutrition*, 130, 761-766.
- Ziegler-Skylakakis, K., Nill, S., Pan, J. F., & Andrae, U. (1998). S-oxygenation of thiourea results in the formation of genotoxic products. *Environmental and molecular mutagenesis*, 31, 362-373.
- Zou, T. B., He, T. P., Li, H. B., Tang, H. W., Xia, E. Q. (2016). The structure-activity relationship of the antioxidant peptides from natural proteins. *Molecules*, 21, 72.